

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Valor de la ecografía e inmunohistoquímica en el diagnóstico
del ganglio centinela en pacientes con melanoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Obdulia Agustina García Olmedo

Directores

José Luis Rodríguez Peralto
Erica Riveiro Meireles
Eduardo Nagore Enguïdanos

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**VALOR DE LA ECOGRAFÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL
DIAGNÓSTICO DEL GANGLIO CENTINELA EN PACIENTES
CON MELANOMA**

Presentada por
Obdulia Agustina García Olmedo

Directores:
Dr. José Luis Rodríguez Peralto
Dra. Erica Riveiro Meireles
Dr. Eduardo Nagore Enguítanos

Madrid, 2019



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Dña Obdulia Agustina García Olmedo, estudiante en el Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: "Valor de la ecografía e inmunohistoquímica en el diagnóstico del ganglio centinela en pacientes con melanoma" y dirigida por los Doctores José Luis Rodríguez Peralto, Erica Riveiro Meireles y Eduardo Nagore Enguídanos.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico

vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de mayo de 2019

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above the printed name.

Fdo.: Obdulia Agustina García Olmedo



D. José Luis Rodríguez Peralto, Profesor Titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid.

Dña. Erica Riveiro Meireles Investigadora asociada al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Doce de Octubre de Madrid.

D. Eduardo Nagore Enguídanos, Profesor Asociado del Departamento de Dermatología de la Universidad Católica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Dña. Obdulia Agustina García Olmedo** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “**Valor de la ecografía e inmunohistoquímica en el diagnóstico del ganglio centinela en pacientes con melanoma**” que a nuestro juicio reúne las condiciones para optar al Grado de Doctor. Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid a 29 de octubre de 2018.

Vº Bº Directores de la Tesis Doctoral

Dr. José Luis Rodríguez Peralto

Profesor Titular

Departamento de Anatomía Patológica

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Dra. Erica Riveiro Meireles

Investigadora asociada

Departamento de Anatomía Patológica

Instituto de Investigación Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid

Dr. Eduardo Nagore Enguídanos

Profesor Asociado

Departamento de Dermatología

Facultad de Medicina

Universidad Católica de Valencia

A mi familia,

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar esta tesis y expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores José Luis Rodríguez Peralto, Erica Riveiro y Eduardo Nagore. Por permitirme la oportunidad de realizar este proyecto, por su inestimable ayuda, su amabilidad y su dedicación.

Quiero agradecer y dedicar esta tesis también a la Doctora Manuela Mollejo, que me puso en contacto con el Doctor Rodríguez Peralto y así pude comenzar este trabajo, y por su ayuda, siempre con una sonrisa, durante las fases iniciales del mismo.

A los Doctores Rosario Carrillo, Ángel Santos-Briz, Carlos Monteagudo, Juan José Ríos y a los Biobancos del Hospital Universitario de la Paz y del Complejo Hospitalario de Toledo, por aportarme sus casos de nevus ganglionar y así poder reunir una muestra suficiente de pacientes para realizar el estudio.

A David Lora Pablos, del Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario 12 de Octubre, por su ayuda con los análisis estadísticos.

A Carlos del Toro y Manuel González, radiólogos del Instituto Valenciano de Oncología, y a los técnicos de radiología y médicos del servicio de Dermatología del Instituto Valenciano de Oncología, por su colaboración directa o indirecta en este trabajo.

A María Brotons Seguí, estudiante de Medicina de la Universidad de Valencia, por su contribución en este trabajo.

A Rosa María García Martín, responsable del Laboratorio de Inmunohistoquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

A todas las personas que contribuyeron a realizar este trabajo: médicos, biólogos y técnicos de los servicios de Anatomía Patológica, de Dermatología y del Biobanco del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Dermatología del Complejo Hospitalario de Toledo, en especial a Elvira Molina, Blas Gómez, Elena Martínez y Álvaro González, que siempre me han dado ánimos para continuar trabajando y a Ana Isabel Sánchez

Moya y Elena Vera Iglesias, que, como tutoras mías durante la formación como médico residente, me facilitaron el poder dedicar más formación para esta tesis.

A mi familia y amigos, que siempre me han apoyado y ayudado a avanzar. En especial a mis padres, que siempre lo habéis dado todo por vuestros hijos y sois nuestro ejemplo a seguir; a mis hermanos, que siempre están ahí y me animan; a mi marido y a mis dos preciosas hijas, Paula y Celia, por hacerme tan feliz.

Finalmente, dedicado a todos los pacientes con melanoma y a sus familias. En especial a mis pacientes, gracias por confiar en mí, sois la motivación para seguir aprendiendo cada día y dar lo mejor de mí.

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN/SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Generalidades del ganglio centinela	27
1.1.1. Evolución histórica	27
1.1.2. Evolución histórica en lesiones melanocíticas, melanoma	30
1.1.3. Técnica del ganglio centinela en melanoma	34
1.1.4. Valor pronóstico en melanoma y complicaciones de la técnica	40
1.1.5. La ecografía como método de estadificación ganglionar en Melanoma	44
1.2. Nevus melanocíticos en ganglios linfáticos	48
1.3. Marcadores inmunohistoquímicos en lesiones melanocíticas	51
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1. Justificación	65
2.2. Hipótesis	66
2.3. Ojetivos	66
3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1. Papel de la ecografía como método de estadificación ganglionar en pacientes con melanoma previo a la biopsia del ganglio centinela	71
3.1.1. Pacientes	71
3.1.2. Métodos	72
3.1.3. Análisis estadístico	73
3.2. Estudio de marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	74
3.2.1. Pacientes	74
3.2.2. Métodos	
3.2.2.1 Variables a estudio	
3.2.2.1.1. Variables clínicas e histopatológicas	75
3.2.2.1.2. Variables moleculares	76
- Melan A	76
- HMB45	77
- P16	77
- P62	77
- DEK	78
- Reticulina	78
3.2.3. Análisis estadístico	79
4. RESULTADOS	81
4.1 Papel de la ecografía como método de estadificación ganglionar	

en pacientes con melanoma previo a la biopsia del ganglio centinela	83
4.1.1. Valoración de la ecografía como técnica de detección de ganglios metastásicos	84
4.1.2. Rentabilidad de la biopsia ecodirigida	85
4.2 Estudio de marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	
4.2.1. Características clínicas e histopatológicas	88
- Edad al diagnóstico	89
- Sexo	90
- Subtipo de melanoma	90
- Localización del melanoma primario	91
- Espesor de Breslow	92
- Nivel de Clark	93
- Localización de la lesión dentro del ganglio	93
- Procedencia del ganglio (Centinela/No centinela)	97
- Desarrollo de metástasis	97
4.2.2. Características inmunohistoquímicas de las lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos. Estudio descriptivo y comparativo	98
4.2.2.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus ganglionares	99
4.2.2.2. Características inmunohistoquímicas de las metástasis ganglionares de melanoma	104
4.2.2.3. Comparación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en nevus ganglionares frente a las metástasis ganglionares de melanoma	109
4.2.2.4. Comparación de la expresión de reticulina	112
5. DISCUSIÓN	117
5.1. La ecografía como método de estadificación ganglionar	119
5.1.1. ¿Puede sustituir a la biopsia selectiva del ganglio centinela?	119
5.1.2. Biopsia ecodirigida	120
5.2. Estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	121
5.2.1. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes	121
5.2.2. Análisis inmunohistoquímico de las lesiones melanocíticas	123
6. CONCLUSIONES	129
7. APÉNDICE	133
7.1. Tablas suplementarias	135
8. BIBLIOGRAFÍA	139

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ganglio linfático de morfología normal	45
Figura 1.2. Nevus ganglionar	48
Figura 1.3. Expresión de DEK en lesiones melanocíticas	60
Figura 1.4. Expresión de p62 en lesiones melanocíticas	62
Figura 3.1. Protocolos de estadificación en melanoma	73
Figura 4.1. Diagrama de flujo del estudio con ecografía ganglionar y biopsia ecodirigida	86
Figura 4.2. Árbol de clasificación para evaluar los falsos negativos asociados a la ecografía ganglionar	87
Figura 4.3. Metástasis ganglionar de melanoma de células balonizantes	88
Figura 4.4. Variable “sexo” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	90
Figura 4.5. Variable “subtipo de melanoma cutáneo” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	91
Figura 4.6. Variable “localización del melanoma cutáneo” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	92
Figura 4.7. Variable “espesor de Breslow” del melanoma cutáneo en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	93
Figura 4.8. Localización de los nevus ganglionares	94
Figura 4.9. Nevus ganglionar subcapsular con extensión intraparenquimatososa	95
Figura 4.10. Otro de los nevus subcapsulares con extensión intraparenquimatososa	95
Figura 4.11. Variable “localización de las metástasis de melanoma en el ganglio”	96
Figura 4.12. Metástasis ganglionares de melanoma de diferente localización	96
Figura 4.13. Variable “procedencia del ganglio”	97
Figura 4.14. IHQ más habitual de un nevus ganglionar	101
Figura 4.15. Expresión de p62 en nevus ganglionar	102
Figura 4.16. Expresión de DEK en nevus ganglionar	103
Figura 4.17. Nevus ganglionar con características IHQ atípicas en cuanto a HMB45	104
Figura 4.18. Metástasis ganglionar de melanoma con las características IHQ más	

habituales	106
Figura 4.19. Expresión p16 en metástasis ganglionar de melanoma	107
Figura 4.20. Expresión de p62 en metástasis ganglionares de melanoma	107
Figura 4.21. Expresión de DEK en metástasis ganglionares de melanoma	108
Figura 4.22. Metástasis ganglionar de melanoma HMB45 negativa	109
Figura 4.23. Comparación de la expresión de marcadores estudiados en nevus ganglionar frente a metástasis ganglionar de melanoma	112
Figura 4.24. Tinción con reticulina en nevus ganglionar	114
Figura 4.25. Tinción con reticulina en metástasis ganglionar de melanoma	115
Figura 4.26. Comparación de la tinción con reticulina en nevus ganglionares frente a metástasis de melanoma	115

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los principales estudios en ecografía ganglionar previa a la BSGC en pacientes con melanoma cutáneo	46
Tabla 3. Anticuerpos, clones, casas comerciales y diluciones utilizados con los 5 marcadores	75
Tabla 4. Variables de los pacientes a los que se realizó ecografía ganglionar	83
Tabla 4.1. Resultados de la ecografía ganglionar y resultados de afectación ganglionar al completar el estudio	84
Tabla 4.2. Características de los pacientes según el resultado de la ecografía ganglionar, la biopsia ecodirigida y el resultado de la BSGC	85
Tabla 4.3. Variable “edad” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos	89
Tabla 4.4. Número de muestras interpretables en cada serie y características IHQ de las mismas	98
Tabla 4.5. Características IHQ de los nevus ganglionares estudiados	99
Tabla 4.6. Características IHQ detalladas por caso de los nevus ganglionares Estudiados	100
Tabla 4.7. Características IHQ de las metástasis ganglionares de melanoma	104
Tabla 4.8. Características IHQ detalladas por caso de las metástasis ganglionares de melanoma	105
Tabla 4.9. Características IHQ de metástasis ganglionares de melanoma y comparación con los nevus ganglionares	110
Tabla 4.10. Características de la tinción con reticulina en nevus ganglionares y metástasis ganglionares de melanoma	113
Tabla 5.1. Resumen de los principales estudios en ecografía ganglionar previa a la BSGC en pacientes con melanoma cutáneo	119

ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BAG	Biopsia con aguja gruesa
BSGC	Biopsia selectiva del ganglio centinela
CLND	Complete lymph node dissection
<i>DEK</i>	oncogén DEK
DEK	oncoproteína DEK
DFS	Disease-free survival
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELND	Elective lymph node dissection
FNA	Fine needle aspiration
GC	Ganglio centinela
HE	Hematoxilina-Eosina
HMB45	Human Melanoma Black 45
HR	Hazard ratio
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
Ki-67	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67
LMA	Leucemia mieloide aguda
Melan-A o MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells
<i>MLANA</i>	Gen que codifica la proteína Melan A
MM	Melanoma maligno
MSLT-I	Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I
MSLT-II	Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial II
MSS	Melanoma specific survival
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NICE	National Institute for Health and care Excellence
OS	Overall survival
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PET	Positron emission tomography
PMEL	Premelanosoma protein
p16 o CDKN2A	proteína p16 inhibidora de quinasas dependientes de ciclina

p62/SQTSM1	p62/Sequestosome-1
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real time -polymerase chain reaction
S100	Solubilidad en solución de sulfato amónico saturado 100% a pH neutro
SLNB	Sentinel lymph node biopsy
TAC	Tomografía axial computarizada
US	Ultrasonography
US-biopsy	Ultrasonography-guided biopsy
VPH	Virus del papiloma humano
WLE	Wide local escision

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

El melanoma es un tipo de cáncer muy agresivo, responsable de más del 90% de las muertes por cáncer de piel y una de las neoplasias con mayor pérdida de años potenciales de vida. Su incidencia está aumentando en todo el mundo durante las últimas décadas. Por todo ello, continúa siendo un reto para el médico, y es nuestro deseo y deber continuar trabajando para mejorar la prevención, el diagnóstico y tratamiento de esta entidad.

La afectación ganglionar, junto con el espesor de Breslow, es el principal factor pronóstico en pacientes con melanoma en estadio clínico localizado. Desde su introducción en 1992, la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), se ha establecido como principal técnica diagnóstica de estadificación ganglionar locorregional. A pesar de ser un método poco invasivo, no está exento de complicaciones. Existen múltiples trabajos que evalúan posibles alternativas a la BSGC: ecografía tradicional, ecografía de alta resolución, con contraste, asociada a punción o biopsia y PET/TAC, con resultados diversos.

Cuando se realiza el diagnóstico histopatológico del ganglio centinela, un hallazgo benigno, que puede resultar conflictivo por su posible confusión con células metastásicas de melanoma, es la detección de células melanocíticas benignas en los ganglios linfáticos (nevus ganglionares). Lo habitual es poder diferenciarlas por sus características citomorfológicas o con los marcadores habituales de IHQ para la identificación de células melanocíticas, pero en ocasiones no podemos discriminar entre células benignas (nevus ganglionar) y malignas (metástasis de melanoma), lo cual es fundamental de cara al pronóstico y tratamiento del paciente. En la actualidad no existe un marcador o un algoritmo diagnóstico que discrimine en el 100% de los casos nevus de melanoma. Además, se han publicado numerosos trabajos estudiando marcadores inmunohistoquímicos en lesiones melanocíticas cutáneas, sin embargo, la literatura médica en cuanto a lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos es más escasa.

Objetivos

- 1- Evaluar la utilidad de la ecografía y de la biopsia ecoguiada en los casos que lo precisen, como métodos diagnósticos de estadificación previos a la realización de la BSGC, enfocado a valorar el porcentaje de casos en los que evita la realización de la BSGC en pacientes con melanoma.
- 2- Estudiar dos nuevos marcadores inmunohistoquímicos, p62 y DEK, en ganglios linfáticos para el diagnóstico diferencial entre nevus ganglionar y metástasis de melanoma.
- 3- Valorar la utilidad de otros marcadores, Melan A, HMB45 y p16, para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos.
- 4- Analizar el patrón de tinción con reticulina en lesiones melanocíticas ganglionares.

Resultados

1- Papel de la ecografía como método de estadificación ganglionar en pacientes con melanoma previo a la BSGC

Se identificaron 384 pacientes. La ecografía como técnica de detección de ganglios metastásicos obtuvo una sensibilidad del 46%, una especificidad del 76%, valor predictivo positivo del 41%, valor predictivo negativo del 79% y tasa de falsos negativos del 20,4%. De los 97 pacientes con ecografía indeterminada, finalmente presentaron metástasis ganglionar 33 (34%).

Se realizó BSGC en 361 pacientes, fue negativa en 282 casos y positiva en 79. De forma global obtuvimos para la BAG una sensibilidad de 44,5%, especificidad de 60,9%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 74,6%. De los 102 pacientes que presentaron metástasis ganglionar, un 22,5% fueron detectadas mediante la biopsia ecodirigida. El porcentaje de falsos negativos fue: grupo de ecografía indeterminada: 16 de 70 (22,8%) y grupo de ecografía patológica: 3 de 5

(60%) y fueron significativamente más frecuentes en mayores de 60 años y con tumores menores de 2 mm de espesor de Breslow.

En nuestro trabajo se evitó la realización de la BSGC en 23 de 384 pacientes (6%).

2- Estudio de marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos

La prevalencia de nevus ganglionar fue del 3,5% en pacientes con melanoma. Los nevus fueron más frecuentes en las mujeres y las metástasis de melanoma en los varones. La edad media fue 56,8. El subtipo clínico de melanoma más frecuente fue el melanoma de extensión superficial. La localización más frecuente del melanoma cutáneo fue el tronco. El espesor medio de Breslow fue 5,3 mm. La mayoría de los nevus ganglionares se localizaron en el estroma fibroso del ganglio (cápsula o septos) y en la zona subcapsular. Se obtuvieron 5 casos de localización poco habitual: 4 casos de localización intraparenquimatosa y uno de localización intravascular. La localización de las metástasis ganglionares de melanoma fue principalmente subcapsular e intraparenquimatosa, aunque en 2,8% de los casos fue capsular.

Se analizaron los marcadores clásicos de lesiones melanocíticas: Melan A y HMB-45 y se compararon con p16 y 2 nuevos marcadores: p62 y DEK, en 79 lesiones melanocíticas de localización ganglionar: 39 nevus ganglionares y 40 metástasis de melanoma.

Se observó positividad para Melan A tanto en nevus como en melanoma, en el 100% y 95% de los casos respectivamente. HMB-45 mostró una alta reactividad las metástasis de melanoma (80%), frente a la escasa expresión en nevus (8,3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0001$). En las lesiones que no se clasificaron bien en función de la expresión de HMB45, esto es, en los 8 casos de metástasis de melanoma HMB45 negativas y los 3 nevus positivos, DEK, p62 y p16 sí ayudaron a un diagnóstico correcto, de forma que en las metástasis DEK y p62 fueron positivos y p16 negativo y en los nevus a la inversa.

P16, mostró muy alta positividad (94,7%) en nevus, nuclear y citoplásmica; en contraste con las metástasis ganglionares de melanoma, en las que se observó pérdida de

la expresión de p16 (10% de casos positivos), principalmente en el núcleo, siendo estadísticamente significativo ($p=0,0001$).

P62 mostró diferencias estadísticamente significativas entre nevus ganglionares (baja expresión: 10,5%) y metástasis de melanoma (alta expresión: 87,5%) ($p=0,0001$).

En relación con DEK, se observó un importante incremento de su expresión en metástasis ganglionares de melanoma (84,6%), frente a nevus (3%, 1 sólo caso), siendo estadísticamente significativo ($p=0,0001$).

Reticulina: Las fibras de reticulina se dispusieron rodeando células individuales en el 90% de los nevus ganglionares. En el 100% de los melanomas las fibras de reticulina se dispusieron rodeando grupos de células.

Conclusiones

1.- La ecografía con biopsia ecodirigida como método diagnóstico de estadificación previo a la BSGC es una herramienta útil que, aunque no la sustituye, permite evitar la realización de la BSGC en un 6% de los casos. La biopsia ecodirigida debe realizarse no solo en las adenopatías con claros signos ecográficos sospechosos de metástasis sino también en las que tienen características ecográficas indeterminadas dado que en un 34% de ellas hay afectación ganglionar metastásica.

2.- DEK y p62 han demostrado su utilidad para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en los ganglios linfáticos, en especial en el diagnóstico de lesiones melanocíticas que no se clasifican correctamente en función de la expresión de HMB-45, esto es en metástasis ganglionares de melanoma HMB-45 negativas y nevus ganglionares HMB-45 positivos. En estos casos en los que la expresión de HMB45 no es la esperable, DEK y p62 se expresan en melanoma y no lo hacen en nevus.

3- Melan A es el mejor marcador para identificar lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos, aunque no es específico, ya que no permite diferenciar nevus de melanomas. HMB45 es uno de los marcadores más útiles para diferenciar nevus ganglionar de metástasis de melanoma, ya que el 91,7% de los nevus ganglionares no lo expresan mientras que el 80% de las metástrasis ganglionares de melanoma si. P16 es

un excelente marcador para discriminar nevus ganglionares de metástasis de melanoma, ya que la pérdida total de la expresión nuclear de p16 es altamente diagnóstico de melanoma.

4- Las fibras de reticulina se disponen envolviendo células individuales en los nevus y grupos de células en las metástasis de melanoma, lo que facilita su diagnóstico diferencial.

SUMMARY

Introduction

Melanoma is the most aggressive skin cancer, being one of the solid neoplasms that causes the greatest potential loss of years of life. Its incidence is increasing in the Caucasian population. Thus, it remains a current challenge for the physician and it is our desire and duty to continue working to improve the prevention, diagnosis and treatment of this entity.

Lymph node status and Breslow thickness are the main prognostic factors in localised melanomas. Sentinel lymph node biopsy (SLNB) has been adopted worldwide as the standard method of lymph node staging. It is a procedure with less comorbidity and it is less invasive than the previous elective total lymphadenectomy, but it is not exempt of minor surgical complications. Therefore, the trend is to look for techniques that involve less comorbidity to the patient, with a similar diagnostic accuracy. We can find a lot of papers studying the role of other radiodiagnostic tools, such as high-resolution ultrasound, fine needle aspiration (FNA) or ultrasound guided biopsy, positron emission tomography/computed tomography (PET/CT), etc

In sentinel lymph node histopathological diagnosis, a benign finding, which can be conflicting by mimicking melanoma metastasis, is the detection of benign melanocytic cells in the lymph nodes (nodal nevus). With attention to cytologic detail, the distribution of the cells, and their immunohistochemical profile usually lead to a satisfactory conclusion. However, in some cases, especially when dealing with micrometastasis, it is still difficult to discriminate between benign (nevus) and malignant (melanoma) cells, which is fundamental to the prognosis and treatment of the patient. Currently, there are not any marker or diagnosis algorithm to allow for differentiate 100 percent between nevi and melanoma. Many studies have been published studying immunohistochemical markers in cutaneous melanocytic lesions; however, the medical literature on melanocytic lesions in lymph nodes is less numerous.

Objectives

- 1- To assess the usefulness of lymph node ultrasound prior to SLNB, and ultrasound-guided biopsy (US-biopsy) if required; focusing in the number of cases ultrasound allow to avoid SLNB.
- 2- To study two new immunohistochemical markers: DEK and p62, which can help us to improve the differential diagnosis between nevus and metastasis of melanoma in the lymph nodes.
- 3- To assess the role of other immunohistochemical markers, Melan A, HMB45 and p16, for differential diagnosis of melanocytic lesions in lymph nodes.
- 4- Analyze the reticulin staining expression pattern in lymph nodes.

Results

1. The role of ultrasonography as staging method in patients with melanoma before SLNB

This study included 384 patients. The sensitivity of US in the detection of positive sentinel lymph nodes was 46%, and the specificity was 76%, positive predictive value was 41%, negative predictive value was 79% and false negative rate was 20.4%.

33 patients out of 97 with suspicious US (34%) had metastasis in their sentinel lymph node histology.

Sentinel lymph nodes were identified and removed in 361 patients. Histologically positive sentinel lymph nodes were found in 79 patients and 282 had a negative histologically study. The sensitivity of ultrasound guided biopsy was 44.5%, specificity 60.9%, positive predictive value 100% and negative predictive value 74.6%. 22.5 percent of 102 patients with metastasis were detected by ultrasound guided biopsy. False negative rate was 16 out of 70 patients (22.8%) in indeterminate group and 3 out

of 5 (60%) in malignant ultrasound characteristics group. False negatives were significantly more common in patients aged over 60 years and in tumors with a thickness of less than 2 mm.

In this study, ultrasound-guided biopsy avoided the sentinel lymph node realization in 23 out of 384 patients (6%).

2. Immunohistochemical markers for the differential diagnosis of melanocytic lesions in lymph nodes

Prevalence of nodal melanocytic nevi was 3.5% in melanoma patients. Mean age was 56.8 years. Primary melanomas were located more frequently in the trunk. The most frequent clinical subtype of melanoma was superficial spreading. The mean Breslow thickness was 5.3 mm.

Most nodal nevi were located in the lymph node fibrous stroma, although four cases showed parenchymatous spreading and there was a perivascular nevus. Most melanoma metastases were located at subcapsular level and parenchyma and 2.8 percent were located intracapsular.

Classical melanocytic markers were analyzed (Melan A and HMB-45) and compared with p16 and two novel markers (p62 and DEK) in 79 nodal melanocytic lesions: 39 nodal nevi and 40 metastatic melanoma.

Melan A showed high expression both in nodal nevi and melanoma lymph node metastasis (100% and 95% respectively). The percentage of HMB-45 positivity reported for melanoma was 80% and the expression in nodal nevi was low, 8.3%. It was statistically significant ($p=0.0001$). The cases HMB45 immunostaining is not expected as melanoma metastasis HMB45 negatives (8 cases) and positives nodal nevi (3 cases), DEK, p62 showed expression in melanoma metastasis but not in nodal nevi and p16 showed expression in nevi but not in melanoma metastasis.

P16 showed an intense and diffuse expression, nuclear and cytoplasmic, in the most of nodal nevi (94.7%), in contrast, melanoma lymph node metastasis showed a lack of p16 expression, mainly nuclear expression (10% positive cases). These differences were statistically significant ($p=0.0001$)

P62 showed statistically significant difference expression between benign and malignant melanocytic lesion in lymph nodes ($p=0.0001$). There was low expression in

nodal nevi (10.5% positive cases) whereas there was high expression in metastatic melanoma (87.5%).

This study demonstrated negligible DEK expression in nodal nevi (3%, only one case). Conversely, melanoma metastasis was largely positive for DEK expression (84.6%). The expression pattern was nuclear. These differences were statistically significant ($p=0.0001$).

Reticulin histochemical stain study: in most of nevi cases (90%), reticulin fibers appeared surrounding individual cells whereas in all melanoma lesions (100%) reticulin fibers appeared surrounding groups of cells.

Conclusions

1.- Ultrasound guided biopsy is a useful method to nodally stage patients with melanoma, although sentinel lymph node biopsy remains the most effective tool. It allows in 6% of patients to avoid sentinel lymph node biopsy. In patients with indeterminate ultrasound characteristics, ultrasound guided biopsy should be performed, because 34% of them will have lymph node metastasis.

2.- DEK and p62 have proved usefulness for differential diagnosis in lymph node melanocytic lesions, specially for differential diagnosis cases HMB45 immunostaining is not expected: melanoma metastasis HMB-45 negative and nodal nevi HMB45 positive. The cases HMB45 immunostaining is not expected, DEK and p62 show expression in melanoma metastasis but not in nodal nevi.

3.- Melan A is the best marker for the detection of melanocytic lesions in lymph nodes although it is not specific, since it is not useful for discriminating between melanoma and nevus cells. HMB45 is one of the most useful markers; a high percentage of nodal nevi (91.7%) are HMB45 negative and 80% of melanoma lymph node metastasis are HMB45 positive. P16 immunostaining is an excellent marker for the differential diagnosis between nodal nevi and melanoma metastasis. Loss of nuclear reactivity of p16 suggests melanoma.

4- The pattern of reticulin staining in melanomas is surrounding groups/nests of melanocytes but individual cells in benign nevi. This helps in the differential diagnosis between both conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL GANGLIO CENTINELA

1.1.1. Evolución histórica

La diseminación linfática de los tumores y sus implicaciones en el tratamiento y supervivencia se han estudiado durante siglos habiéndose establecido diferentes teorías sobre la diseminación de los tumores sólidos, basadas en datos experimentales y en observaciones durante el seguimiento de pacientes con cáncer. Entre ellas se encuentra la discusión sobre el papel que juega la disección de los ganglios linfáticos regionales. La disección electiva en bloque de los ganglios linfáticos ha sido objeto de controversia ya que se realizaba en muchos pacientes que no tenían metástasis linfáticas, sin obtenerse beneficio en supervivencia y además con una morbilidad no desdeñable.

Con la introducción del concepto de biopsia del ganglio centinela surge un procedimiento mínimamente invasivo que nos permite detectar metástasis en ganglios linfáticos antes de que estas sean detectables clínicamente y evitar realizar vaciamientos ganglionares cuando estos no van a ser en teoría beneficiosos. Ha supuesto uno de los principales avances en la cirugía oncológica en la actualidad y se emplea dentro de un proceso multidisciplinar en diferentes tipos de cáncer.

La técnica de la biopsia del ganglio centinela fue descrita en 1992 por los doctores Donald L. Morton, cirujano, y Alistair J. Cochran, anatomopatólogo (1,2), aunque comenzó a desarrollarse muchos años atrás (3,4).

Existen descripciones de pacientes con cáncer en antiguos papiros egipcios (3000 A.C.)(4), aunque debemos remontarnos a la antigua Grecia, con Hipócrates (460-370 A.C.) para hallar sus orígenes. Hipócrates de Cos es considerado el primer médico griego que se dedicó al tratamiento del cáncer, y a él se debe gran parte de la terminología, en concreto la denominación de cáncer. También describió los ganglios linfáticos y una enfermedad con metástasis ganglionar. Aunque no está aclarado que él sea el autor de todas las obras que se le atribuyen dentro del corpus hipocraticum, a efectos prácticos se le considera como tal. Dentro de la extensión del corpus hipocraticum, la sección dedicada al cáncer es breve y trata principalmente de

manifestaciones clínicas y tratamiento, considerando el cáncer una manifestación local de una enfermedad sistémica (5). Herophilus (300 BC) en la Escuela de Anatomía de Alejandría, en animales vivos, describió por primera vez que los vasos linfáticos terminaban en glándulas del mesenterio. Herasistratus (280 BC) describió el contenido lechoso de dichos vasos. Aunque ambos creían que se trataba de vasos sanguíneos (4).

En 1622, Gasparo Aselli, un profesor de Anatomía y Cirugía en Pavia, Italia, operó a un perro vivo y redescubrió los conductos mesentéricos “lácticos”, en perros y en otros animales. Fue quién realizó la primera descripción sistemática de forma científica del sistema linfático, aunque bajo la denominación de “venas lácteas”, destacando su papel en la digestión del quilo.

El descubrimiento de estos vasos en humanos tuvo lugar en 1628, cuando Gassendi y colaboradores examinaron el contenido abdominal de una paciente fallecida una hora antes. Johann Vessling (1634), Caecilius Folius y Nicolaas Tulp (1639), Wallee (1641), y Jean Pecquet (1649) confirmaron la existencia de estos vasos separándolos de las arterias y las venas. Thomas Bartholin (1616-1680) describió el conducto torácico, diferenció el sistema linfático del sistema sanguíneo y postuló que la linfa se originaría de la filtración de la sangre. Dio a los linfáticos su denominación actual “*vasa lymphatica*”. La palabra *lympa* proviene del latín y significa “agua clara de primavera”. Otros investigadores posteriormente mapearon el sistema linfático. Uno de ellos fue Anthony Nuck (1650-1692), profesor de Anatomía en Leiden, que inyectando mercurio mezclado con estaño hizo los vasos visibles, lo que produjo un mayor avance en el descubrimiento de la anatomía del sistema linfático. Virchow (1821-1902) sugiere que los ganglios linfáticos tienen función de filtro dentro del sistema linfático, filtrando las partículas de la linfa. Propuso que los fluidos linfáticos de cualquier parte del cuerpo drenaban a los ganglios linfáticos, en concreto a un ganglio linfático y desde este a los siguientes, lo que nos hace pensar que la teoría del ganglio centinela nace con este autor. Realizó esta propuesta a partir de la observación en una autopsia de tinta de un tatuaje del brazo de un marinero en un ganglio linfático. El anatomista francés Marie Philibert Constant Sappey usando la técnica de Nuck dibujó un atlas del sistema linfático, publicado en 1874, que sirvió a los cirujanos durante un siglo. Basándose en estos hallazgos, los médicos del siglo XIX plantearon que para el correcto tratamiento local del cáncer deberían tratarse también los ganglios linfáticos. Herbert Snow (1847–1930), cirujano Británico, que trabajó en el Cancer Hospital de Londres (actual Royal Marsden Hospital, primer centro especializado en cáncer del mundo), estaba muy

interesado en melanoma y publicó un artículo en 1892 sobre la extirpación ganglionar electiva como método de elección, basándose en los trabajos de Virchow. Los hallazgos de Virchow también inspiraron a otros importantes autores, como William S. Halsted (Baltimore) quién propuso la realización de mastectomía más linfadenectomía en bloque en 1894. Halsted había trabajado en Europa y en contacto con Virchow (4,6). Así es como la cirugía del sistema linfático cobró importancia dentro de la cirugía Oncológica de muchos tumores (4).

Posteriormente en 1896, Dimitrie Gerota (1867-1939) modernizó la técnica de visualización del sistema linfático, mediante azul de Prusia, publicando su método. El primer uso en vivo de la inyección de azul de Prusia para visualizar el sistema linfático lo publicaron Hudack y McMaster-en 1933. En 1950 Walker fue el primero en usar radiotrazadores para mapear el drenaje linfático. En 1953 Sherman y colaboradores demostraron el transporte de oro coloidal desde un punto intradérmico a los ganglios linfáticos. En 1958 se obtiene la primera imagen de un nódulo radiactivo por Sage y Gozun, tras la administración de una proteína coloidal marcada con oro en un perro, tomando la imagen con un escáner (7).

En 1970 se inicia el empleo de gammacámaras para la localización del ganglio centinela. La linfoescintigrafía se utilizó inicialmente para la evaluación del edema y delimitar el campo de radiación en pacientes con cáncer de mama. La primera publicación intraoperatoria data del 1984, en un paciente con cáncer de recto en el que se administró anticuerpos contra CEA marcados con I^{131} . Posteriormente se usó para visualizar metástasis óseas y ganglionares en cáncer de colon (3).

Desde 1977 el grupo de Donald L Morton y Alister Cochran, del John Wayne Cancer Institute, usaron la linfoescintigrafía con oro coloidal para identificar los patrones de drenaje linfático de los melanomas de localizaciones ambiguas. Además de este procedimiento preoperatorio, desarrollaron y publicaron en 1992 la técnica para mapeo intraoperatorio y extirpación selectiva de los ganglios con drenaje directo del melanoma primario, estableciendo el término de ganglio centinela (1,2), como la primera localización de la enfermedad metastásica (4).

La era de la cirugía moderna comenzó a mediados del siglo XIX, con la introducción de la asepsia y la anestesia. Posteriormente se desarrolló la cirugía oncológica. Inicialmente se realizaban extirpaciones muy amplias, principalmente por el diagnóstico tardío. Desde hace 40 años la tendencia es a cirugías lo menos extensas

posible, teniendo en cuenta la extirpación completa sin el compromiso de la supervivencia. La técnica actualmente aceptada de biopsia del ganglio centinela va en consonancia con esta tendencia, y la linfadenectomía en bloque se reserva para pacientes con metástasis ganglionares. Gracias a esta técnica, pacientes con cáncer de mama, de vulva o pene y melanomas, se benefician de no sufrir linfadenectomía completa en aquellos casos innecesarios, tras un estadiaje más preciso, del que se obtiene buena información pronóstica y control local de la enfermedad, con mejora de la supervivencia (8).

1.1.2. Evolución histórica en lesiones melanocíticas, melanoma

El melanoma en el siglo XIX

La primera publicación sobre un paciente con melanoma, en concreto sobre una metástasis ganglionar, ha sido atribuida a John Hunter, en 1787, dicha pieza de resección se conserva en el Museo Hunteriano en el Real Colegio de Cirujanos de Inglaterra (8,9). Posteriormente René Laennec describió el proceso de la enfermedad “cáncer negro”, en 1806. Laennec también identificó depósitos en los pulmones, vísceras abdominales, peritoneo, ojo y pituitaria. En 1812 comenzó a usar el término de “melanosis” y otros autores posteriormente lo aceptaron (8,10). En 1820 William Norris publicó lo que él llamó “el primer caso genuino de melanoma”, que inicialmente se había denominado “enfermedad fungoide”; Una vez extirpado recidivó rápidamente en la cicatriz, presentó metástasis ganglionares predecesoras de múltiples lesiones subcutáneas y del fallecimiento del paciente (8,11). Conforme fue avanzando el siglo XIX, fueron publicándose nuevas descripciones de melanoma. Se publicó el primer caso de melanoma en un paciente negro, descrito por Pemberton (8,12), el melanoma subungueal, por Hutchinson (8,13) y melanoma amelanótico por Tennent (8,14). En 1851 Fergusson describió en *The Lancet* la extirpación de un depósito secundario de melanoma en un ganglio (8,15).

Herbert Snow y melanoma

Herbert Snow (1847–1930), cirujano londinense interesado particularmente en el melanoma, fue uno de los controvertidos defensores de la extirpación ganglionar electiva profiláctica en bloque antes de su aceptación como técnica estándar (8).

En los escritos de Snow se trata ampliamente del melanoma y se adelanta a su tiempo en lo que respecta a la linfadenectomía. A pesar de no ser una técnica habitual, el defendía lo que llamó “Anticipatory gland excision” consistente en la extirpación de los ganglios linfáticos regionales, en todos los pacientes con melanoma, antes de que fueran palpables, como una medida de sentido común, de forma que el llamado por entonces “infective protoplasm” no se diseminara de los ganglios al torrente sanguíneo. Señalaba, además, que se trata de una intervención sin complicaciones graves (en términos de mortalidad) necesaria para erradicar la enfermedad, ya que una vez que las células cancerosas superaban el filtro ganglionar pasaban a la sangre produciendo metástasis viscerales y la muerte del paciente (8,16). En un extracto de su artículo “Dr H Snow on Melanotic Cancerous Disease” describe la historia natural del melanoma cutáneo. Habla de que la aparente trivialidad de la lesión pigmentada frecuentemente nos hace no ser conscientes del peligro que entraña hasta que no se ha extendido a los ganglios linfáticos, momento en el que ya es demasiado tarde para la extirpación quirúrgica. Comenta que, respecto al tratamiento quirúrgico, la extirpación del tumor cutáneo tiene poca repercusión en la supervivencia; que el peligro radica en la difusión de las partículas malignas desde el foco primario y esto siempre ocurre hacia los ganglios linfáticos más cercanos. Cuando los ganglios son palpables por su aumento de tamaño es un signo del depósito de las partículas malignas en ellos, pero es un signo tardío, implicando ya la extensión a órganos y tejidos profundos. Hablaba de que por entonces se tomaban medidas para tratar sólo la lesión primaria, cuando era primordial la extirpación completa de los ganglios linfáticos antes de que estuvieran afectados (8,17). Sin embargo, en estas primeras etapas de la historia del melanoma, la disección de los ganglios linfáticos fue objeto de controversia y las teorías sobre el cáncer de Snow fueron ampliamente criticadas. Snow creía que el cáncer podía no ser debido a un microorganismo, como abogaban las creencias de la época, pero pasarían muchos años hasta que prosperaran otras teorías. Snow escribió en 1890 que para prevenir la recidiva del cáncer era vital la correcta extirpación quirúrgica de todas las partículas malignas, ya que si quedaba alguna, estas crecerían indefectiblemente, multiplicándose. Describía también la necesidad de un diagnóstico temprano antes de la diseminación del cáncer

para lograr la curación (16). Muchas de sus teorías se mantienen vigentes en la actualidad.

Donald L. Morton y Alister Cochran

En 1990, Morton, cirujano americano, presentó el concepto de biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) en el melanoma en el Annual Meeting of the Society of Surgical Oncology. Morton definió el ganglio centinela como aquel ganglio cuyos conductos linfáticos aferentes son los primeros en recibir la linfa del melanoma primario (siendo un concepto funcional más que anatómico) (1,2). Hasta entonces, el manejo de los ganglios linfáticos regionales de los pacientes con melanoma considerado de alto riesgo tenía dos opciones: una, la extirpación electiva de los mismos (siglas en inglés ELND), extirpando “a ciegas” los ganglios linfáticos regionales en bloque y dos, “esperar y ver”, y en el momento que los ganglios fueran palpables realizar la intervención en bloque. El realizar una ELND tenía la ventaja de extirpar entre un 20 – 30 % según las series, de metástasis ganglionares subclínicas, y evitar así su diseminación; sin embargo, conllevaba una morbilidad no desdeñable, linfedema de la extremidad afectada, además de las complicaciones locales propias de la intervención. La opción de “esperar y ver” tenía la principal desventaja de que en aquellos pacientes en los que no se hacía disección ganglionar inicial y desarrollaban metástasis ganglionares, el pronóstico y la supervivencia global empeoraban. Para evitar la morbilidad de la ELND sin correr el riesgo de “esperar y ver” y que el melanoma se diseminara a los ganglios linfáticos y más allá, estos autores desarrollaron y propusieron la técnica de la biopsia del ganglio centinela(1). Primero realizaron los ensayos en gatos (2). Posteriormente extendieron los estudios a series de pacientes con melanoma. La tinta de marcaje se inyectaba intradérmicamente en la zona adyacente al melanoma primario o al lugar de la extirpación o biopsia excisional. Los ganglios linfáticos regionales, confirmados mediante linfoescintigrafía con dextrano marcado con tecnecio, en las zonas con patrón de drenaje linfático ambiguo, eran expuestos quirúrgicamente, examinando los linfáticos aferentes mediante el paso de tinta. Los ganglios linfáticos que se teñían de color azul se extirpaban con un margen de 2 cm alrededor e inmediatamente se examinaban mediante secciones en fresco congeladas y técnicas rápidas de inmunohistoquímica para identificar células de melanoma. Mientras se realizaba el análisis anatomopatológico se realizaba la ampliación de márgenes del melanoma primario extirpado. Si el ganglio o ganglios centinelas presentaban células

tumorales se realizaba linfadenectomía completa en el mismo acto quirúrgico, si era negativo se daba por finalizada la intervención (2).

En la era de la extirpación selectiva del ganglio centinela, el equipo de Morton introdujo la linfoescintografía para detección del ganglio centinela en los melanomas de tronco y Cochran, demostró que la S-100 es fundamental en la estadificación, ya que es un excelente marcador de metástasis de melanoma en ganglio centinela incluso de pequeño tamaño (18). Comenzaron sus estudios en los 80, en animales de experimentación y posteriormente en humanos. Presentaron sus 100 primeros pacientes en el congreso de la Organización Mundial de Melanoma en Venecia en 1989, en esta ocasión su publicación sólo fue aceptada como póster. Ellos perseveraron y ampliaron la muestra, y aunque en varias revistas lo rechazaron, consiguieron finalmente su publicación y se considera un artículo clásico y muy citado. *Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg. 1992;127:392–399* (1)

Posteriormente al trabajo de Morton, la hipótesis de que el estado histológico del GC, estudiado mediante la técnica de la BSGC, refleja el estado del resto de los ganglios del mismo territorio ganglionar fue confirmada por múltiples estudios, entre los que destacan los de Reintgen (19) en estados Unidos y Thompson en Australia (20). Para validar dicha hipótesis, estos estudios incluyeron la práctica de la BSGC junto con una linfadenectomía completa inmediata en todos los casos, de manera que todos los ganglios del territorio se examinaban. Las diferentes series de enfermos así analizados mostraron unos resultados que coincidían con el trabajo de Morton, identificando alrededor de un 20 % de pacientes con metástasis ocultas (GC positivo). La gran mayoría de ellas se encontraban limitadas a los ganglios identificados como GC, estableciendo sin embargo una tasa de fallos de la técnica (GC negativo para metástasis pero alguno de los ganglios no-centinela positivos) del 1-2%. A partir de dichos estudios, la técnica de la BSGC se ha ido perfeccionando y estandarizando, y en la actualidad se usa de forma rutinaria para la estadificación del melanoma (21,22) y también de otros tumores sólidos.

1.3. Técnica del ganglio centinela en melanoma

El procedimiento de la biopsia selectiva del ganglio centinela se basa en la hipótesis de la existencia de un patrón ordenado de la posible diseminación metastásica

por las vías linfáticas hacia la región ganglionar y el funcionamiento de los ganglios linfáticos como filtros eficaces de las células tumorales. Este hecho conduce a considerar como ganglios centinela aquellos ganglios con un drenaje directo procedente del tumor primario.

Desde su introducción en 1992 (1,2,23), la técnica de localización del ganglio centinela se ha basado clásicamente en tres aspectos fundamentales: la visualización del ganglio centinela mediante la realización de una prueba de imagen, principalmente una linfogammagrafía, previa al abordaje quirúrgico, la utilización de sondas detectoras y colorantes durante la cirugía y el posterior análisis anatomopatológico de los ganglios extirpados (1,2,23–26).

Para la realización de la BSGC se requiere de la colaboración de un equipo multidisciplinar con experiencia que incluya a un dermatólogo/oncólogo habituado en la indicación de la prueba, un cirujano, un radiólogo de medicina nuclear y un anatomopatólogo. Cada uno de los miembros del equipo intervendrá en uno de los cinco pasos de la técnica: selección de los pacientes, mapeo linfático prequirúrgico, detección intraoperatoria y exéresis del GC, examen microscópico y, en ocasiones, molecular del GC y linfadenectomía radical precoz en aquellos pacientes con ganglio positivo.

Selección de pacientes: La BSGC se indica en aquellos pacientes que tienen un riesgo potencial de extensión linfática y en los que el procedimiento supone un beneficio mayor que las posibles complicaciones de la técnica; las diferentes guías establecen los criterios de selección, con mínimas variaciones de unas a otras (27–29):

Hasta la fecha, basándose en la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) de 2009, la guía de práctica clínica del National Comprehensive Cancer Network de 2015 (NCCN) indicaba que se debe ofrecer al paciente con melanoma la opción de la BSGC con tumores en estadio clínico I y II a partir del estadio pT1b (<1mm con ulceración o presencia de mitosis o de >0.76 mm). Según esta guía, no se recomienda realizar la técnica en melanomas de menos de 0.75 mm salvo cuando existan características de riesgo (ulceración, actividad mitótica, edad joven o invasión linfovascular). En estos casos, al igual que en los melanomas con un grosor de entre 0.76 y 1 mm sin ulceración ni mitosis (estadio pT1a de la clasificación 2009), la decisión de realizar la técnica ha de tomarse en el seno de un comité multidisciplinar, de

acuerdo con la voluntad del paciente, teniendo en cuenta su edad y posibles comorbilidades. (28). Con la nueva clasificación TNM de la octava edición de la AJCC (2017) se redefinen las indicaciones, recomendando realizar la BSGC a pacientes con melanomas de espesor de 0,8 a 1 mm con o sin ulceración o menor de 0,8 mm con ulceración (estadio pT1b), sin tener en cuenta para la estadificación el número de mitosis (22).

La guía del National Institute for Health and care Excellence (NICE) 2015 y la de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2012 concluyen que no hay suficiente evidencia para recomendar la BSGC en pacientes con melanomas con un espesor de Breslow < de 1 mm, ya que sólo es una herramienta de estadificación. Recomiendan considerarla en pacientes seleccionados con factores de alto riesgo cuando los beneficios de una correcta estadificación superen los riesgos del procedimiento, ya que una estadificación más precisa puede permitir un manejo y posiblemente un tratamiento más precoz de la diseminación linfática junto con la posibilidad de adscribirse a ensayos clínicos de adyuvancia. Los factores de alto riesgo incluyen ulceración o mitosis mayor o igual a 1/mm² especialmente en el subgrupo de 0.76-1 mm de Breslow(27,29). Al igual que la guía del NCCN, con la nueva clasificación TNM de la octava edición de la AJCC se redefinen las indicaciones, el espesor de Breslow se ajusta a la décima más cercana y no se incluye para la estadificación el número de mitosis (22).

Para melanomas gruesos (>4 mm), aunque se ha sugerido que podría no ser razonable realizar la BSGC por el alto riesgo de metástasis sistémicas, las principales guías de práctica clínica (NCCN, NICE, ASCO) recomiendan ofrecer la BSGC para pacientes con melanomas gruesos siempre con fines de estadificación y para facilitar el control regional de la enfermedad, posibilitando además la participación de algunos pacientes en ensayos clínicos de adyuvancia. Siempre se debe ofrecer al paciente previamente información detallada de las ventajas y desventajas del procedimiento (27–29).

Como hemos comentado, con la incorporación de la octava edición de la AJCC en 2017, se introducen varios cambios en la clasificación TNM. Se recomienda la medición del espesor de Breslow en décimas y las mitosis ya no se utilizan como criterio de categorización en la estadificación (aunque debe seguir indicándose como factor pronóstico en todos los estadios). Los rangos de espesor tumoral de la categoría T se mantienen; sin embargo, T1 se ha subcategorizado en dos según el umbral de 0,8 mm: - pT1: Melanoma de 1,0 mm o menos de espesor, estado de ulceración desconocido o no especificado

- pT1a: Melanoma de menos de 0,8 mm de espesor, sin ulceración
- pT1b: Melanoma de menos de 0,8 mm de espesor con ulceración o melanoma de 0,8 a 1,0 mm de espesor con o sin ulceración (22).

Realización de la BSGC: En primer lugar se realiza de forma preoperatoria una prueba de imagen para visualizar el/los ganglios linfáticos centinelas, la más usada clásicamente ha sido la linfogammagrafía, aunque existen otras como la combinación de SPECT/TC que pueden usarse de forma complementaria y aportan una mayor resolución (30). El empleo de una técnica de imagen es fundamental en regiones del organismo con drenajes complejos o ambiguos, como cabeza y cuello y zona superior y línea media del tronco. También gracias al empleo de una prueba de imagen se ha descubierto la existencia de múltiples ganglios centinela por territorio ganglionar, de ganglios centinela aberrantes (fuera de los territorios linfáticos convencionales) y de ganglios linfáticos en tránsito (en territorios intermedios como, por ejemplo, en localización poplítea o cubital) (21). En la linfogammagrafía, el paciente no precisa ninguna preparación especial, únicamente retirar la ropa y objetos que lleve. Se emplea como radiotrazador un trazador coloidal marcado con Tc99m. El radiotrazador no es selectivo para las metástasis, el mecanismo de captación está relacionado con el proceso de fagocitosis del trazador por parte de los macrófagos ganglionares, proporcionando una retención prolongada en los ganglios linfáticos. Este proceso fisiológico proporciona un lapso de tiempo adecuado para la detección del ganglio centinela mediante las imágenes gammagráficas y también para la localización intraoperatoria con gammacámaras portátiles. En España, los radiotrazadores utilizados con mayor frecuencia son el nanocoloide de albúmina, el coloide de estaño y el sulfuro de renio. Hay un acuerdo general por el que el tamaño de las partículas varía entre 50 y 200 nm para una óptima localización del ganglio centinela, habiendo un compromiso entre la rapidez del drenaje linfático y una adecuada retención del radiotrazador en el ganglio centinela (31). Se inyecta de forma intradérmica sobre la cicatriz de la biopsia escisional del tumor, en 4 puntos alrededor. Posteriormente se realiza la adquisición de las imágenes, de forma planar en la linfogammagrafía o tomográfica mediante SPECT/TC.

En la adquisición planar se toman imágenes estáticas a los 30 minutos y 2 horas de la inyección del trazador (precoces y tardías) con lo que se consigue identificar los ganglios centinela en la mayoría de los casos. En los protocolos actuales, la adquisición tomográfica mediante SPECT/TC se realiza posteriormente a las imágenes tardías

(después de 2 horas tras la administración del trazador) y se adquieren las imágenes realizando una órbita de 360°. Habitualmente se definen los ganglios centinela desde el punto de vista gammagráfico como 1) los primeros ganglios que aparecen en el estudio dinámico o en las imágenes secuenciales en una región ganglionar concreta, 2) los conectados directamente con la zona de inyección por un canal linfático, o 3) cuando se da una combinación de estos 2 criterios. Los ganglios que aparecían posteriormente en la misma región linfática se consideraban ganglios secundarios. Hay que analizar diversas zonas linfáticas y en diferentes estudios temporales para valorar la posible presencia de ganglios centinela de aparición asincrónica. Posteriormente tiene lugar el procesamiento de las imágenes y su interpretación. Finalmente se presenta en placa, papel o en formato digital las imágenes estáticas o la reconstrucción tomográfica si se realizó SPECT/TC.

Aunque la linfogramagrafía convencional sigue desempeñando un papel fundamental para discernir qué áreas linfáticas acogen el drenaje del tumor y que ganglios centinela deben extirparse, difícilmente proporcionará una información detallada de la localización anatómica y de la profundidad real del ganglio centinela. Esta información es importante no sólo para la extirpación del ganglio, sino también para una mejor planificación de las opciones quirúrgicas. Se han desarrollado nuevas herramientas en este campo, como la combinación de SPECT/TC(30), fusionando la información funcional (SPECT) con la morfológica (TC) en una sola sesión. Las imágenes resultantes (multimodalidad) han ido mostrando el o los ganglios centinelas en un entorno anatómico de gran utilidad para el cirujano. Están indicados especialmente en aquellas localizaciones con drenajes no habituales o complejos, como cabeza y cuello, zona superior del tronco y línea media del mismo. El TC empleado es de tipo multimodalidad y no precisa alta dosis. En áreas complejas se realizan cortes de 2 mm y en áreas superficiales (zona axilar, inguinal) con cortes de 5 mm es suficiente para una buena información. Se realiza una reconstrucción multiplanar proporcionando una visión en los tres planos del espacio de las imágenes fusionadas de TC y SPECT. También pueden visualizarse mediante *Maximum intensity projection*, una herramienta que permite una visión tridimensional al añadir diversos cortes, lo que mejora la localización anatómica de los ganglios centinela y su reconocimiento por parte del cirujano. Las indicaciones de la SPECT/TC en el procedimiento de localización del ganglio centinela dependerán de los criterios adoptados por el equipo multidisciplinar en los diversos hospitales, pero en general, las indicaciones son las siguientes (29):

- 1- Detección de los ganglios centinela en casos sin visualización en las imágenes planares.
- 2- Localización de ganglios centinela en áreas con anatomía compleja y un elevado número de ganglios linfáticos como el territorio de cabeza y cuello.
- 3- Localización anatómica y detección de ganglios centinela en áreas de drenaje linfático profundo o ambiguo.

Por su adquisición rápida y fácil, así como por su capacidad para reproducir directamente el mapa del drenaje linfático, las imágenes secuenciales planares de la linfogammagrafía son muy útiles para la identificación de los canales linfáticos y los ganglios centinela prequirúrgicamente; sin embargo, en una buena parte de los casos, la localización anatómica de estos ganglios centinela es de gran ayuda la SPECT/TC (30). Posterior a la visualización preoperatoria del GC, se lleva a cabo la detección quirúrgica y extirpación del ganglio centinela (uno o varios); para ello, además de la localización preoperatoria ya comentada, se pueden utilizar varias técnicas que ayuden a la misma; colorantes, sondas detectoras y más recientemente gammacámaras portátiles o combinación de ambas. Suele realizarse de una a tres horas después de la administración del radiotrazador. Puede inyectarse tinta azul para visualizar el canal linfático y su llegada al ganglio centinela, 0,5- 1 ml; los más empleados son el azul vital, iosulfán azul y azul patente; se administran de forma intradérmica en 4 puntos alrededor de la cicatriz de la extirpación. Suelen tardar unos 5 minutos en recorrer el drenaje linfático hasta el ganglio. Se realiza una incisión en la localización donde se anticipó que se encuentra el ganglio centinela y se utiliza una sonda detectora o gammacámara portátil para detectar el mismo con la ayuda visual del colorante (32).

Una vez que el ganglio linfático es identificado, se extirpa y se mide la radioactividad *ex vivo*. Adicionalmente se extirparán otros ganglios si han sido compatibles preoperatoriamente con ganglio centinela. Posteriormente se escanea la cuenca linfática con la sonda detectora o la gammacámara y se extirparán aquellos ganglios con una radioactividad dos veces superior al fondo del campo quirúrgico y *ex vivo* igual o superior al 10% del primero (32), esto es lo más aceptado y ha sido denominado por el grupo del *Sunbelt Melanoma Trial* como “la regla del 10%”; con esta definición se minimiza la posibilidad de olvidarse algún ganglio centinela y no se incrementa de forma exagerada el número de ganglios que se extraen. Además, es el mismo criterio utilizado para la biopsia del ganglio centinela en el cáncer de mama (31). Aunque estos son los criterios aceptados, es objeto de controversia que captación debe

considerarse como ganglio centinela, y no siempre el ganglio que más capta corresponde al ganglio centinela, como tampoco todos los ganglios centinelas se tiñen de colorante.

Posteriormente tiene lugar la evaluación anatomopatológica del ganglio centinela. Los diferentes grupos de estudio han diseñado sus protocolos. La mayoría están de acuerdo en la baja precisión del estudio intraoperatorio del material congelado, debido a su baja sensibilidad para la detección de metástasis, tan solo un 47% (33). En cambio, los distintos protocolos no están tan de acuerdo en cómo de exhaustivo debe ser el análisis anatomopatológico del GC. De acuerdo con la hipótesis de Cochran (1,2) los melanomas típicamente metastatizan en el espacio subcapsular a lo largo del plano central del ganglio. Por ello, estos autores propugnan realizar no más de 10 cortes cada 2-4 micras de cada cara central de un ganglio seccionado por su mitad longitudinal. Sin embargo, ha sido ampliamente demostrado que cuanto más se profundiza en el nivel de corte existe una mayor probabilidad de encontrar una metástasis. Por esta razón otros autores son partidarios de realizar cortes alternos del ganglio cada 1-2 mm, y estudiar un número variable de secciones (entre 3 y 20) de cada corte.

En cuanto a la técnica de tinción utilizada, de forma general se acepta la tinción con hematoxilina-eosina (HE) convencional. Si no se detectan metástasis, la mayoría de los autores recomiendan usar tinciones adicionales de IHQ en las secciones contiguas a la analizada con HE. Inicialmente, muchos de los estudios recomendaban la proteína S100 citoplasmática (anti-S100 policlonal), altamente sensible para la detección de células melanocíticas, aunque poco específica, ya que se expresa también en las células dendríticas. La mayoría de los autores prefieren el anticuerpo dirigido contra la proteína Melan-A, una proteína hallada en los melanosomas inmaduros, ya que es muy sensible y más específico que S100 para células melanocíticas (21). Además, se suelen emplear marcadores IHQ más específicos de melanoma como el marcador molecular HMB45 (HMB45 monoclonal), anticuerpo dirigido contra la proteína Pmel 17/gp100, expresada en los melanosomas inmaduros, para diferenciar células melanocíticas benignas (nevus) de malignas (melanoma)(21). En el mercado también existen combinaciones de anticuerpos melanocíticos (los denominados «panmelanomas» que permiten la detección de HMB45, Melan-A y tirosinasa, entre otros, en una sola reacción)(34). Con la combinación del estudio de multisecciones y el uso de HE e IHQ en cada corte, la precisión del estudio anatomopatológico se incrementa hasta un 15 % con respecto al

estudio únicamente con HE de las caras centrales de cada mitad del ganglio, aunque los inconvenientes son que es muy laborioso y su elevado coste (21). La principal dificultad consiste en realizar el diagnóstico diferencial entre las células de melanoma con otros grupos celulares con similitudes inmunohistoquímicas. Por ejemplo, no es infrecuente observar en el ganglio linfático células dendríticas paracorticales, macrófagos, células de Schwann de los nervios intraganglionares y paraganglionares o células ganglionares, todas ellas S100 positivas, que pueden ser erróneamente diagnosticadas como células de melanoma. También la presencia de pigmento que provenga de un tatuaje o de antracita puede resultar engañosa, sobre todo en el estudio macroscópico de la pieza (32). Pero existe una dificultad añadida en el estudio de las metástasis de melanoma en el ganglio: la observación de la presencia de células melanocíticas benignas (no-melanoma) en los ganglios linfáticos y su diferenciación de las malignas, que se tratará ampliamente en otro apartado de esta introducción.

Continúan los esfuerzos para mejorar la detección de metástasis ocultas; entre ellos, se está investigando el uso de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar RNA mensajero de tirosinasa y otros marcadores en los ganglios linfáticos. Aunque la RT-PCR a menudo detecta marcadores de células tumorales en ganglios histológicamente negativos, tal presencia no ha sido consistentemente correlacionada con recaída clínica y el significado biológico de estos hallazgos permanece incierto. De momento el uso de RT-PCR se reserva para investigación y ensayos clínicos y no debe emplearse en la práctica clínica habitual (35).

1.1.4. Valor pronóstico en melanoma y complicaciones de la técnica

El valor pronóstico y terapéutico de la biopsia del ganglio centinela, y la consecuente linfadenectomía selectiva si el resultado es positivo para metástasis en los pacientes con melanoma, es objeto de controversia en la actualidad. Ha sido evaluado por varios ensayos clínicos randomizados prospectivos con un tiempo de seguimiento largo y está siendo evaluado en la actualidad también.

El *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I* (MSLT-I) es el primer ensayo clínico de mayor tamaño realizado para evaluar el papel del mapeo linfático con BSGC para determinar el valor pronóstico y su impacto en la supervivencia en los pacientes con melanoma primario. Se trata de un ensayo clínico prospectivo y randomizado (36).

El *Sunbelt Melanoma Trial* es otro ensayo clínico prospectivo, randomizado, que también se realizó para evaluar la supervivencia después de BSGC (SLNB siglas en inglés) y tras tratamiento con interferón (IFN) alfa -2b en términos de supervivencia global (OS siglas en inglés) y supervivencia libre de enfermedad (DFS siglas en inglés) (37,38). El *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial II* (MSLT-II) evalúa la utilidad de la disección ganglionar completa (CLND en inglés) de los ganglios linfáticos regionales, tras detectar metástasis en la SLNB frente a la observación y seguimiento ecográfico y CLND cuando se detecta recidiva clínicamente (39).

El MSLT-I comenzó a incluir pacientes en 1994 y finalizó la inclusión en 2002, con un total de 2001 pacientes. Los resultados fueron publicados a comienzos de 2014. Los pacientes fueron randomizados y divididos en dos grupos, al primero (60%) se les realizaba únicamente escisión local amplia del melanoma primario (WLE en inglés) y observación de los ganglios linfáticos regionales y al segundo grupo (40%) WLE más SLNB e inmediata CLND si el ganglio centinela era positivo para metástasis. El ensayo evaluó 1347 pacientes con melanomas de espesor intermedio (1.2 – 3.5 mm de Breslow), que es el grupo de pacientes en los que se esperaba encontrar mayor beneficio, 340 pacientes con espesor de Breslow <1.2 mm y 340 con melanomas gruesos, de > 3.5 mm. El análisis por grupos fue el siguiente (35):

Grupo de pacientes con melanomas de grosor intermedio (Breslow 1,2- 3,5 mm): La incidencia de metástasis ganglionares fue similar en ambos grupos. El resultado final es que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de SLNB y observación en cuanto a supervivencia específica dependiente de melanoma (MSS en inglés) en 10 años (81.4% y 78.3% respectivamente; hazard ratio [HR] 0.84; $p=0,18$), sin embargo se encontró un aumento en la DFS a 10 años del 71,3% vs 64,7% (HR 0,76, $p=0,01$) a favor del grupo de SLNB. Los pacientes que tenían metástasis en el ganglio centinela tenían peor pronóstico que aquellos en los que los ganglios eran negativos, con una supervivencia específica dependiente de melanoma a 10 años del 62,1% frente a 85,1% para ganglios positivos y negativos respectivamente (HR 3,09, $p<0,001$). En un análisis multivariante, los investigadores hallaron que el estado en cuanto a metástasis del ganglio centinela era el factor pronóstico más importante como predictor de recidiva o muerte por melanoma. Los pacientes con metástasis en la SLNB que recibían CLND inmediata fueron comparados con el grupo en el que se realizó observación y linfadenectomía completa tras detectarse clínicamente metástasis ganglionar y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a DFS a

favor del primero (54,8% vs 35,6%; HR 0,62; $p=0,02$). De los pacientes con metástasis ganglionar, la MSS a 10 años fue superior de forma estadísticamente significativa en aquellos pacientes en los que se realizó SLNB y CLND inmediata respecto al grupo de observación, en los que se realizó CLND una vez que durante la observación se detectaron las metástasis (62,1% vs 41,5%; HR 0,56; $p=0,006$). El MSLT-I concluyó que el uso de la SLNB en pacientes con melanomas de grosor intermedio es no sólo factible, si no que incrementa la DFS y disminuye el riesgo de recidiva ganglionar y metástasis a distancia. La MSS fue mayor estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con SLNB y CLND inmediata por metástasis que en aquellos en que se realizaba observación y CLND cuando se detectaban clínicamente las metástasis, apoyando la idea de que la detección de metástasis ocultas vía SLNB es beneficiosa para el paciente (36).

Grupo de pacientes con melanomas gruesos (Breslow $>3,5$ mm): De los 314 pacientes, 311 fueron aptos para el análisis por protocolo. La incidencia de metástasis ganglionar en el grupo de SLNB fue del 32,9% y adicionalmente 12 pacientes con SLNB negativa desarrollaron posteriormente metástasis, con lo que la incidencia de metástasis a 10 años fue del 42%. En cuanto a la MSS a 10 años no se observaron diferencias entre ambos grupos (58,9% frente 64,4% en el grupo de SLNB y en el grupo de observación respectivamente, HR 1,12, 95% CI 0,76-1,67). Cuando se analizan los pacientes de ambos grupos con metástasis ganglionares, (metástasis detectadas en la SLNB y metástasis detectadas durante la observación) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en MSS ni en DFS.

Grupo de pacientes con melanomas finos (Breslow $<1,2$ mm): aunque el estudio incluyó 340 pacientes, la incidencia de eventos fue tan escasa que no permite analizar objetivos.

Aunque el protocolo estándar de actuación es realizar linfadenectomía regional completa si el ganglio centinela resulta positivo en la SLNB, sólo un 15 – 18 % del resto de los ganglios extirpados (no centinelas) contiene metástasis; el MSLT-II ha sido diseñado para determinar si es necesaria la CLND en pacientes con ganglios centinela positivo en la SLNB. El objetivo primario fue MSS. Objetivos secundarios eran OS, DFS, precisión de la histopatología, marcadores moleculares e inmunológicos y calidad de vida. El estudio comenzó en diciembre 2004 y a comienzos de 2014 finalizó el reclutamiento de pacientes, con un total de 3531. 1939 pacientes con SLNB positiva fueron randomizados y asignados a recibir CLND inmediata u observación mediante

ecografía de alta resolución cada 4 meses durante 2 años, después cada 6 meses durante los años tercero, cuarto y quinto y posteriormente anual. En el análisis por intención de tratar en 1934 pacientes y en análisis por protocolo de 1755 pacientes, la CLND no se asoció con aumento de MSS; en el análisis por protocolo, la media de MSS a 3 años fue similar en ambos grupos ($86 \pm 1,3\%$ en el grupo de linfadenectomía y $86 \pm 1,2\%$ en el grupo de observación). La tasa de DFS a los 3 años fue ligeramente superior en el grupo de linfadenectomía ($68 \pm 1,7\%$, respecto al grupo de observación $63 \pm 1,7\%$), basada en un aumento de la tasa de control de enfermedad regional ($92 \pm 1\%$ y $77 \pm 1,5\%$ respectivamente). Las metástasis en los ganglios no centinela, identificadas en $11,5\%$ de los pacientes en el grupo de linfadenectomía, fueron un factor pronóstico independiente e importante de recidiva. Las conclusiones de este estudio han sido que, en pacientes con metástasis en la SLNB, la CLND aumenta la tasa de control regional de la enfermedad y proporciona información pronóstica aunque no aumenta la MSS (39).

Tras los resultados del MSLT-I, la mayoría de los autores y centros especializados en el manejo de los pacientes con melanoma defienden que, actualmente, es apropiado realizar la técnica de la BSGC a aquellos pacientes con melanoma que cumplan los criterios para su indicación, informando siempre al paciente de los potenciales riesgos y beneficios de la técnica y de cómo influirá en su manejo la información que nos aporte la prueba. Además, debemos recordar que la BSGC se aplica, hasta la fecha, con intención diagnóstica y no terapéutica (36). Los resultados del MSLT-II apoyan para algunos autores la realización de CLND frente a observación ecográfica en aquellos pacientes con BSGC positiva, aunque ello no se acompañe de aumento de la MSS (39).

Con respecto a las complicaciones de la técnica de BSGC, en el MSLT-I se detectó una incidencia de complicaciones del $10,1\%$ (en comparación con $37,2\%$ en los pacientes con CLND). Las más frecuentes fueron infección de la herida quirúrgica, seroma/hematoma, linfedema, dolor y parestesias. Se reportaron sólo $0,2\%$ de reacciones alérgicas asociadas al uso de colorante azul, especialmente el iosulfán azul. Se pudo concluir que es un procedimiento seguro para el diagnóstico de enfermedad regional en pacientes con melanoma primario (36). En el MSLT-II se observó una incidencia de linfedema del $6,3\%$ en el grupo en el que se realizó BSGC y observación y del $24,1\%$ en el grupo de CLND (39).

1.1.5. La ecografía como método de estadificación ganglionar en melanoma

En las últimas décadas, la ecografía ha adquirido un protagonismo creciente en el ámbito de la Dermatología. Hasta el momento son múltiples sus aplicaciones, tanto en patología inflamatoria como en patología tumoral. De hecho, el melanoma es uno de los tumores que más se ha beneficiado de sus avances tecnológicos, tanto para el diagnóstico inicial como para el seguimiento. Tal es así que hoy en día la ecografía cutánea se ha posicionado como herramienta diagnóstica no invasiva, con múltiples aplicaciones en el campo del melanoma, como determinar el espesor tumoral y analizar la vascularización intratumoral, con objeto de conocer factores pronósticos a tiempo real, así como ayudar al diagnóstico de metástasis subcutáneas y ganglionares durante la estadificación inicial y durante el seguimiento con objetivo de disminuir la morbimortalidad (40).

Una de las principales aplicaciones de la ecografía ganglionar es la detección precoz de metástasis, ya sea durante la estadificación previa a la BSGC o durante el seguimiento. Además, resulta útil para realizar punciones diagnósticas ecodirigidas en ganglios de pequeño tamaño o de difícil acceso evitando el abordaje quirúrgico, así como para la colocación de arpones metálicos ecoguiados previa a la cirugía (40).

Desde el punto de vista ecográfico, los ganglios linfáticos tienen 2 capas claramente distinguibles: la más externa, hipoeoica, rica en linfocitos, que se denomina cortical, y la más interna, hiperecoica, compuesta por tejido graso, tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, que se denomina hilio (Figura 1.1.)

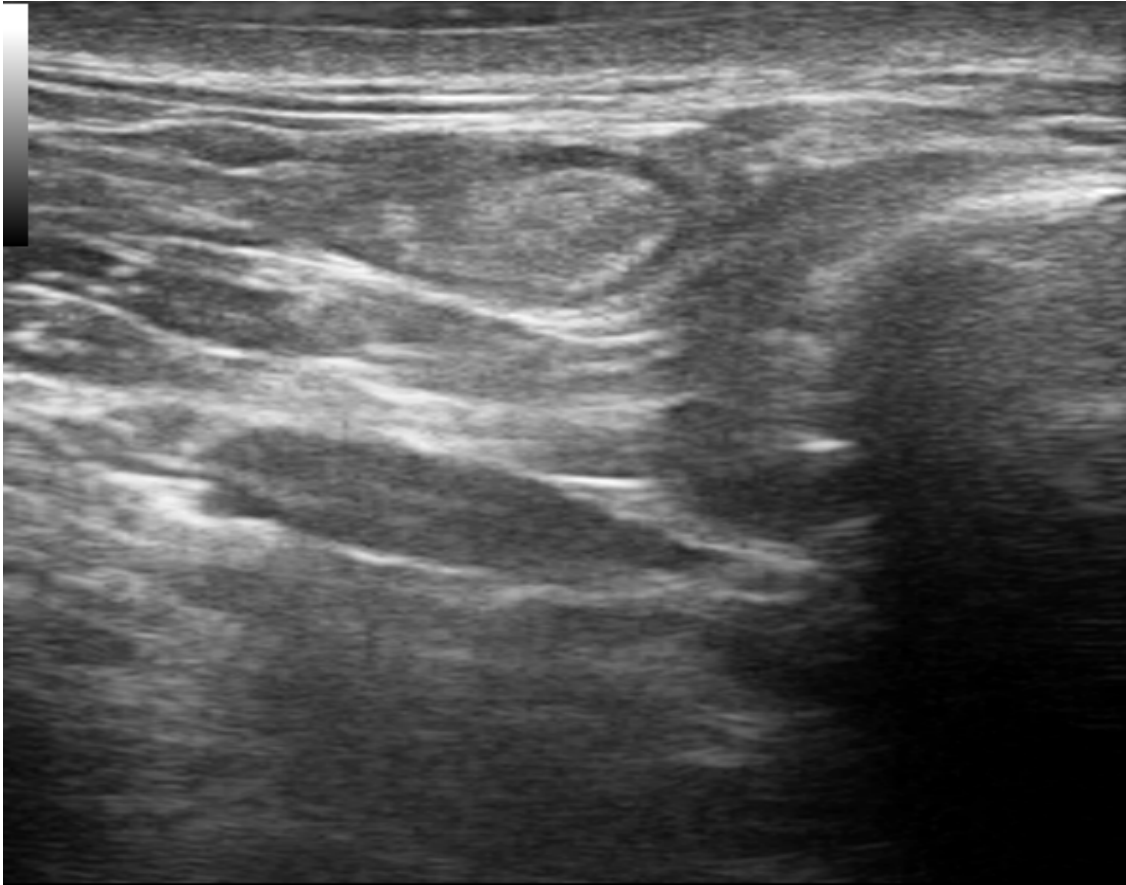


Figura 1.1. Ganglio linfático de morfología normal. Localización cervical. Paciente adulto. Se aprecian 2 capas; la más externa, hipoeoica, rica en linfocitos, denominada cortical, y la más interna, hiperecoica, compuesta por tejido graso, tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, que se denomina hilio.

En función de la edad y localización de los ganglios, estos varían en tamaño, forma y morfología. Así, por ejemplo, los ganglios axilares e inguinales tienen un amplio hilio hiperecoico que puede estar ausente en los ganglios del cuello, aunque los niños y adultos jóvenes tienen más tejido linfático que los adultos y, por tanto, menos hilio (40). La ausencia de hilio, el crecimiento excéntrico de la cortical, la adquisición de forma redondeada, la pérdida de homogeneidad de la estructura interna, la pérdida del tejido graso periganglionar y en algunos casos el aumento de tamaño suelen ser criterios de malignidad. En cuanto a la vascularización, en los ganglios normales los vasos entran por el hilio y se distribuyen de forma regular hacia la periferia, sin llegar a la cortical. En los ganglios metastásicos, la infiltración tumoral distorsiona y destruye la distribución vascular ganglionar (40). A pesar de que existen múltiples trabajos que tratan de definir los hallazgos ecográficos de los ganglios metastásicos en melanoma,

los hallazgos ecográficos utilizados en la bibliografía son a veces contradictorios (41). Además, son pocas las series que han analizado la precisión de cada signo o la variabilidad interobservador, tratándose de una técnica dependiente del operador (40).

Desde su introducción en 1992 (1,2), la BSGC se ha establecido como técnica principal de estadificación locorregional, evitando en muchos casos realizar una linfadenectomía total innecesaria. A pesar de ser un método poco invasivo no está exento de complicaciones, principalmente locales (seroma, hematoma, infección de la herida quirúrgica, etc) y más raramente linfedema y los pacientes deben someterse a una anestesia general o radicular, con los riesgos que supone. Por ello, la tendencia es a buscar técnicas diagnósticas microinvasivas y se han publicado varios trabajos evaluando el papel de la ecografía tradicional, ecografía de alta resolución, la punción aspiración con aguja fina guiada por ecografía, la ecografía con contraste y PET/TC, con resultados diversos (40,42–55). La ecografía ganglionar previa a la BSGC se posiciona como una técnica diagnóstica no invasiva que trata de reducir la morbilidad y el número de realizaciones de BSGC. En caso de detectar ganglios sospechosos sería necesario realizar una punción de la zona sospechosa (Punción-aspiración con aguja fina (PAAF) o biopsia con aguja gruesa (BAG), y si esta es positiva, linfadenectomía.

La sensibilidad de la ecografía ganglionar previa a la BSGC varía según los estudios, desde un 30% hasta un 65% (56,57). Los resultados de los principales estudios publicados se resumen en la tabla 1.1.

Tabla 1. Resumen de los principales estudios en ecografía ganglionar previa a la BSGC en pacientes con melanoma cutáneo.

Estudio	Método	N	Breslow w Mm	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Bossi et al, 2001(43)	Ecografía	94	ND	89,4	90,3	65,3	97,6
Rossi et al, 2003(50)	PAAF guiada por ecografía	125	ND	39	100	100	85
Hocevar et al, 2004(45)	PAAF guiada por ecografía	57	ND	71	84	59	90
Van Rijk et al, 2006(10)	PAAF guiada por ecografía	107	2,0	34	87	59	70

Voit et al, 2009(58)	PAAF guiada por ecografía	400	1,8	65	99	93	92
Sanki et al, 2009(49)	Ecografía	716	2,8	24,3	96,8	59,6	88,3
Hinz et al, 2013(44)	Ecografía vs PET/TC	20	5,3	11,8 0	100 100	100 0	73,7 71,1
Rubaltelli et al, 2014(48)	Ecografía vs Eco con contraste	540	ND	71 98	100 99	ND ND	ND ND
Ulrich et al, 2015(59)	PAAF guiada por ecografía	800	1,6	56	99	92	89

N= Número total de pacientes incluidos en el estudio; S= Sensibilidad; E=

Especificidad; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo. ND= No disponible.

La principal limitación de la PAAF guiada por ecografía es el tamaño de los implantes tumorales, que pueden escapar a la ecografía debido a su pequeño tamaño. Un estudio del Melanoma Institute Australia calculó que el tamaño de los nidos tumorales en los ganglios debía ser de al menos 4,5 mm para poder ser detectados por ecografía (50). Como cabe esperar, en los diferentes estudios se observa que la sensibilidad de la PAAF guiada por ecografía aumenta paralelamente al incremento del estadio T en la clasificación TNM y del diámetro de las micrometástasis en el ganglio (58,59). En concreto, en el trabajo de Voit y colaboradores (58) obtienen que la PAAF guiada por ecografía tiene una sensibilidad del 86% para implantes mayores de 1 mm, que descende al 46% en implantes de entre 0,1 y 1 mm y es del 23% en implantes menores de 1 mm. En la actualidad se encuentra en marcha un largo estudio prospectivo multicéntrico en múltiples países, el USE-FNAC, por la European Organisation for Reserch and Treatment of Cancer (EORTC) Melanoma Group que, basándose en los nuevos criterios morfológicos y mejoría tecnológica de la ecografía, evalúa el papel de la PAAF guiada por ecografía, previa a la realización de la BSGC, realizándose posteriormente en todos los pacientes BSGC y comparando los resultados. De forma adicional, la realización de una ecografía ganglionar previa a la BSGC aporta información al cirujano para el abordaje quirúrgico, al poner de manifiesto las estructuras vasculares adyacentes (40)

1.2. NEVUS MELANOCÍTICOS EN GANGLIOS LINFÁTICOS

La existencia de inclusiones nevocelulares melanocíticas intraganglionares fue descrita por primera vez en 1931 por Stewart y Copeland (60), y desde entonces se han publicado varios cientos de casos (61–67). Consisten en agrupaciones de células névicas de mayor o menor número, frecuentemente formando agregados o nidos de tamaño variable pero lo más habitual es que sean de pequeño tamaño, incluso formadas por pocas células (62–66,68,69) (Figura 1.2.)

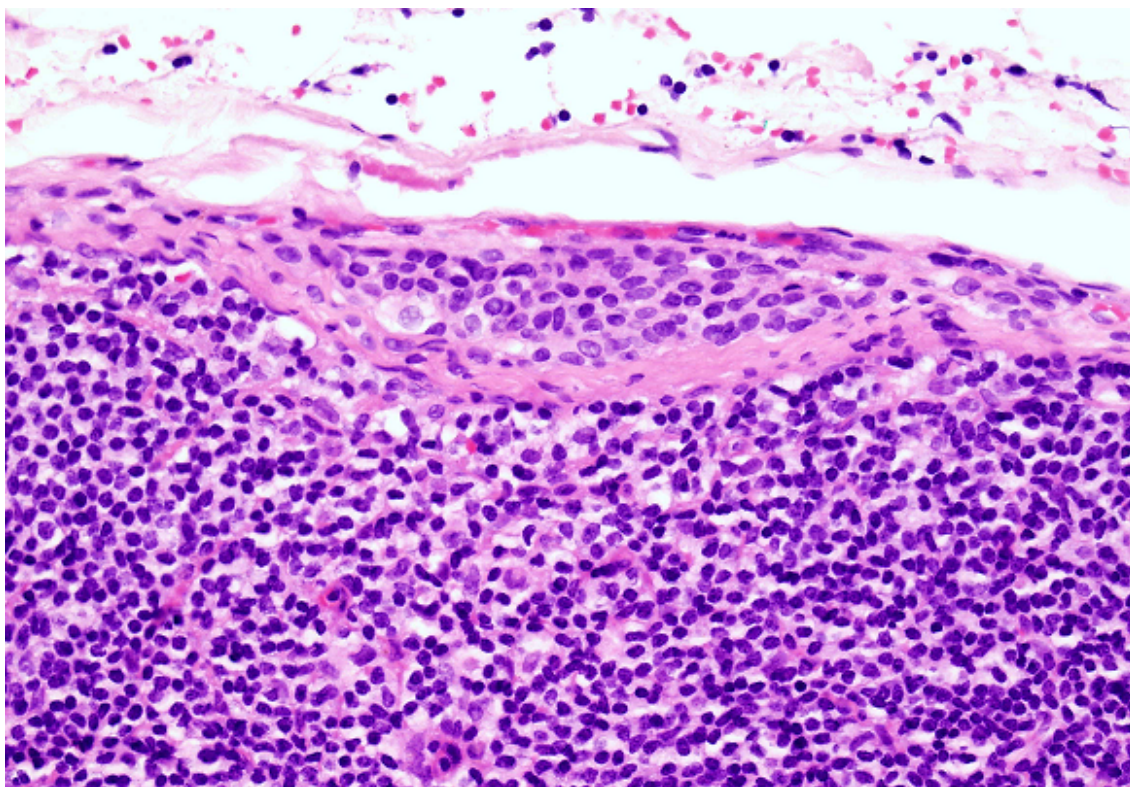


Figura 1.2. Nevus ganglionar. Se observa en la zona intracapsular una agrupación de células melanocíticas sin atipia citológica.

Su incidencia varía según las series, entre 0,017% y 22% de los ganglios extirpados, siendo más frecuente en los ganglios extirpados por melanoma que por otros tumores sólidos (63). Una de las series más largas, publicada por Piana et al (67) recoge todas las biopsias ganglionares desde 2000 a 2014, con un total de 26240 ganglios, de los que 416 (1,5%) pertenecían a BSGC de 399 pacientes con melanoma y 4276 (17%) a BSGC de 4205 pacientes con cáncer de mama; Del total de muestras detectan nevus ganglionar en 60 casos (0,2%) de 58 pacientes. Si se tienen en cuenta sólo los casos en

los que se realiza BSGC por melanoma, se detectan nevus en 12 de 416 (4,3%) y en BGC por cáncer de mama en 33 de 4276 (0,3%) y en 5 casos la BSGC se realizó por otras neoplasias o por adenopatías palpables (8,3%). En esta serie, los nevus nodales encontrados en ganglios centinela representan un 50% de los casos de nevus reclutados mientras que el 50% restante proviene de ganglios no centinela o adenopatías palpables) (67).

Hasta la actualidad sólo se han detectado nevus en ganglios linfáticos de drenaje superficial (cervicales, axilares e inguinales), no habiéndose descrito en ganglios profundos y de drenaje visceral (70). Se localizan preferentemente en el estroma fibroso de los ganglios, sobre todo entre la cápsula y los septos fibrosos adyacentes, y menos frecuente, a nivel parenquimatoso (67,69) y en los sinusoides periféricos y centrales (71)

A pesar de su naturaleza benigna, el principal problema que nos plantean es el diagnóstico diferencial con las metástasis de melanoma, sobre todo con las micrometástasis, ya que en algunos casos, principalmente aquellos en los que se observan uno o varios nidos pequeños de células melanocíticas, puede ser especialmente difícil y de gran transcendencia de cara al pronóstico o tratamiento del paciente (64,69). De hecho, lo más habitual es que los nevus ganglionares sean de pequeño tamaño. En la serie de Piana et al (66) la talla media es de 1,4 mm, con un rango de 0,1 a 7 mm, siendo el número de nidos de 1 a 6 (67).

El mecanismo por el cual melanocitos benignos son transportados a los ganglios linfáticos es objeto de controversia y permanece sin aclarar, existiendo principalmente dos hipótesis:

- a) La primera, denominada “fenómeno de metástasis benigna”, que se basaría en la existencia de un transporte de melanocitos desde la piel hasta su ganglio linfático de drenaje a través del sistema linfático (72,73). Patterson y cols (70) aboga por esta teoría apoyándose en el argumento de que en pacientes con metástasis de melanoma en los ganglios se pueden observar también células névicas benignas y esto se debería al hecho de que cuando un melanoma se desarrolla sobre un nevus y metastatiza, arrastraría consigo células benignas; pero aunque es un hecho relativamente frecuente, sobre todo en casos asociados a un nevus cutáneo congénito, no siempre existe un nevus previo; por ejemplo

en la serie de Holt et al. (60) sólo 6 de los 8 pacientes con nevus ganglionar tenían un nevus cutáneo previo.

Otro hecho que apoya esta teoría es el aislamiento de nevocitos en el torrente sanguíneo y linfático, lo que implica la pérdida de adherencia de las células del progenitor névico y su recolección por los linfáticos de la dermis, atravesando posteriormente los ganglios linfáticos sin ser secuestrado (cuando se aísla vía hematogena) o implantándose en el ganglio. También podría producirse el transporte de células névicas a los linfáticos durante la realización de la biopsia del melanoma (63,67).

En contrapartida, esta hipótesis deja algunas cuestiones sin resolver; no explica el hecho de porqué las células névicas benignas que “metastatizan” no se encuentran en otros órganos internos, como pulmones o cerebro, como ocurre con el melanoma; Por otro lado, esto podría deberse a características intrínsecas de las células que evitan la implantación y crecimiento en estos tejidos, y de hecho si esto fuera cierto, el conocimiento de estas características podría tener beneficios terapéuticos (72).

- b) La segunda, denominada “modelo embriológico”, explica la existencia de nevus nodal, de forma que las células névicas llegarían a los ganglios linfáticos transportadas desde la cresta neural durante la vida intrauterina, todas estas células o un progenitor común que se reproduciría en el ganglio. Para algunos autores, la asociación estadísticamente significativa de nevus ganglionar con nevus congénito, encontrada en varios estudios, apoya la teoría embriológica (61,62).

Las características morfológicas de los nevus nodales son bastante constantes. Están formados por células névicas similares en la mayoría de los casos al componente intradérmico de un nevus cutáneo, aunque también en ocasiones pueden asemejarse a las células névicas de un nevus de Spitz o un nevus azul (68); son relativamente uniformes, con escaso pigmento melánico, citoplasma pálido, eosinófilo, de bordes mal definidos, núcleo redondeado con delicada cromatina, discreto nucléolo basófilo, mínima o ninguna actividad mitótica, sin atipias ni focos de necrosis y con ausencia de invasión vascular o neural (figura I.2.). En algunos casos se observa una distribución perivascular peculiar (67). Estudios ultraestructurales han confirmado su similitud con células melanocíticas de nevus intradérmico, incluyendo la presencia de melanosomas.

Se han descrito casos con características diferentes; Piana y colaboradores (66) describen 4 pacientes con nevus ganglionar de características peculiares. En 2 casos en la BSGC de un cáncer de mama la agrupación de células névicas presentaba características de nevus azul, con melanocitos hiperpigmentados entre fibras de colágeno de la cápsula del ganglio. En los otros 2 casos, el agregado de melanocitos fue muy numeroso y de gran tamaño.

También con relativa frecuencia coexisten en el mismo ganglio nevus y metástasis de la neoplasia que motivó la extirpación (61,63,67).

A pesar de que las características morfológicas de los nevus ganglionares son bastante constantes, ocasionalmente es difícil diferenciar células névicas benignas de metástasis de melanoma, o excluirlo por completo, únicamente por sus características histológicas, por lo que es preciso ayudarse de técnicas inmunohistoquímicas.

Inmunohistoquímicamente, como hablaremos más adelante, las células névicas ganglionares expresan intensamente y de forma difusa la proteína S-100 y Melan-A, siendo negativas para HMB-45 y con escasa actividad proliferativa, bajo Ki67. Sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos convencionales no son capaces de establecer el diagnóstico diferencial con las metástasis de melanoma en muchos de los casos, por lo que pueden ser necesarias técnicas adicionales (67,74,75).

1.3. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LESIONES MELANOCÍTICAS

Desde la identificación de la proteína S100 como marcador inmunohistoquímico en la década de los 80 (76), han sido investigados múltiples marcadores que pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial de las lesiones melanocíticas. Existen muchas variaciones entre ellos, tanto en su expresión en los diferentes subtipos de melanoma como en su sensibilidad y especificidad, ya que algunos de ellos pueden expresarse en lesiones no melanocíticas, como tumores de partes blandas o carcinomas.

La proteína S100 (S100) fue aislada y purificada por Moore, en 1965, a partir de un extracto de cerebro bovino (77). Se denominó S100 por su solubilidad en sulfato amónico saturado al 100% a pH neutro. Es una proteína de pH isoelectrico muy ácido, hidrosoluble, de bajo peso molecular (21000-24000 daltons)(77). Varios años más tarde se observó que estaba compuesta por una mezcla de 2 tipos de proteínas; S100A y S100B y que no era específica del sistema nervioso central (78,79). En la actualidad, la

familia de proteínas S100 constituye uno de los grupos más grandes de proteínas fijadoras de calcio, formado por un grupo heterogéneo de al menos 25 proteínas ácidas de bajo peso molecular. Están codificadas por varios genes, la mayoría localizados en el cromosoma 1q21, en el llamado clúster de diferenciación epidérmica, un área que está frecuentemente alterada en varios tumores, como el melanoma (52,53). Se encuentran exclusivamente en vertebrados y tienen capacidad para formar homodímeros, heterodímeros y oligodímeros. La familia de proteínas S100 son proteínas multifunción que se expresan en un variado espectro de tejidos y que, a través de su interacción con varias proteínas efectoras, están implicadas en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares: contracción, motilidad, crecimiento celular y diferenciación, progresión del ciclo celular, organización estructural de membranas, transcripción, dinámica del citoesqueleto celular, protección celular frente al estrés oxidativo, fosforilación proteica y secreción (80). Se han descrito niveles alterados de proteínas S100 en humanos en varias enfermedades como cáncer, enfermedades inflamatorias, cardiomiopatías y enfermedades neurodegenerativas (81). Además, algunos subtipos de S100 (S100A1, S100A4, S100A6, S100A7 y S100B) están implicados en la progresión tumoral y otros (S100A2 y S100A11) se cree que son supresores tumorales (82,83).

En 1980, Gaynor et al describieron por primera vez la expresión de S100 en líneas celulares de melanoma humano (76), y el año siguiente, el mismo grupo de investigadores demostraron la positividad para S100 en todos los melanomas estudiados, siendo sin embargo negativa para el resto de tumores no melanocíticos que estudiaron (84). Estudios posteriores demostraron que S100 se expresaba intensamente en todos los subtipos de nevus, incluidos junturales, dérmicos, compuestos, displásicos, congénitos, Spitz, nevus nodales y en todas las variantes de melanoma, tanto primarios como metastásicos (85–88).

La sensibilidad de la proteína S100 para melanoma es muy alta, se expresa en el 93-100% de los casos según las diferentes series publicadas (89–93). El patrón característico de tinción en las lesiones melanocíticas es fuerte y difuso y localizado tanto en el núcleo como en el citoplasma. Aunque en ocasiones puede ser focal, o incluso negativo (89). S100 es uno de los pocos marcadores de melanoma que se expresan de forma constante en los melanomas desmoplásicos (89). S100 no es específico de melanocitos. Así, en tejidos normales se expresa en grado variable en las siguientes células: astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, algunas poblaciones neuronales, pituicitos, ependimocitos, condrocitos, células mioepiteliales,

células epiteliales de riñón, células de Langerhans, células dendríticas y algunas subpoblaciones de linfocitos (94–97). Se expresa a su vez en neoplasias: en algunos carcinomas principalmente de mama y de glándulas salivares, en sarcomas como rhabdomyosarcomas, leiomyosarcomas y tumores derivados de la vaina de nervios periféricos y en histiocitosis de células de Langerhans. A excepción de esta última, en el resto de neoplasias la positividad para S100 es relativamente baja y suele ser focal (98).

Por su alta sensibilidad para el diagnóstico de melanoma, algunos investigadores han recomendado su uso para la detección de metástasis de melanoma en los ganglios linfáticos; sin embargo, debido a su expresión en las células dendríticas presentes en los ganglios es menos empleado, ya que este hecho dificulta el diagnóstico diferencial con células tumorales individuales (99).

Melan A, también conocido como MART-1, es un antígeno de melanoma que es reconocido por linfocitos T citotóxicos (100–103). En 1994, el gen *MELAN A* fue aislado en la línea celular de melanoma humano SK-Mel29 en el *Ludwig Institute for Cancer Research* de Bruselas y fue llamado melan A probablemente como abreviatura de antígeno melanocítico (103). Este mismo gen fue independientemente aislado en el *National Cancer Institute* en Bethesda, usando una línea celular diferente, y fue designado MART-1 por las siglas de *Melanoma Antigen Recognized by T cells* (101). Melan A es una proteína transmembrana de 18 kd, compuesta por 118 aminoácidos y codificada por el gen *MELAN A* localizado en el cromosoma 9p24.1. El análisis de RNA mensajero en células y tejidos humanos indica que melan A es un antígeno de estirpe melanocítica que se expresa exclusivamente en melanocitos de piel y retina (101,103). Melan A está principalmente presente en melanosomas y en el retículo endoplásmico y juega un papel importante en la expresión, estabilidad y procesamiento de la proteína premelanosoma 17 (PMEL17), que es necesaria para la formación del estadio II de los melanosomas (104). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado la expresión de melan A en todos (100%) los tipos de nevus intradérmicos, junturales, compuestos, displásicos, Spitz y congénitos, así como en los nevus capsulares en los ganglios linfáticos (105). También se expresan en la mayoría de melanomas primarios y metastásicos. El porcentaje de melanomas primarios que expresan melan A varía de un 85% a 97% según las diferentes series (105–107) y entre un 57% y 92% de los melanomas metastásicos (89,90,105,108–112). De forma global, encontramos expresión de melan A en un 86% de los melanomas metastásicos, según una revisión de 1183

pacientes con melanoma publicados en 12 series (89,90,105–111,113–115). Sin embargo, el melanoma desmoplásico suele ser melan A negativo (89,105,109,116–120), encontrándose una media de 7% de positividades según los estudios (89,105,109,116–120). El patrón de tinción es citoplásmico (113,114,121–123). Melan A reacciona también con células de musculo liso perivasculares de la linfangiomatosis, angiomiolipoma renal, tumores adrenocorticales (112) y tumores estromales de ovario (123). Melan A no se expresa en células dendríticas en los ganglios linfáticos, ni en histiocitos, por lo que es útil para facilitar el diagnóstico en esta localización (111).

HMB45 es un anticuerpo monoclonal que reacciona frente a PMEL17, también conocida como gp100, SILV, ME20 y D12S53E, una glicoproteína citoplasmática de 10 kDa que forma parte del complejo gp100-premelanosoma, producto del gen SILV localizado en el cromosoma 12q13-q14 (124). Fue descubierto en la línea celular de melanoma pigmentado Mel-1, que deriva de un ganglio linfático afectado por metástasis (125). La denominación de HMB proviene de la descripción del inmunógeno usado: Human Melanoma Black (126). La proteína PMEL17, como hemos comentado previamente, es fundamental para la organización estructural de los melanosomas (124). Por microscopía inmunoelectrónica se observa que HMB45 reacciona en primer lugar con la matriz fibrilar de los melanosomas en estadio II y secundariamente con los melanosomas en estadio I multivesicular, esto hace que por microscopía electrónica se observen como estriaciones intraluminales en los melanosomas estadio II. En estos se deposita la melanina, pasando a melanosomas estadio II, dando lugar a su oscurecimiento y aumento de tamaño (124,127–129). Por ello, es más adecuado considerar a HMB45 como un marcador organela-específico más que celular-específico (88). El patrón de tinción es citoplásmico (121,130).

HMB45 reacciona con los melanocitos cutáneos fetales y con el epitelio pigmentado de la retina prenatal e infantil, pero no con los melanocitos adultos normales (131).

También reacciona con los nevus juntales y con el componente juntal de los nevus compuestos, pero es negativo en los nevus intradérmicos, en el componente profundo de los nevus compuestos y en los nevus de los ganglios linfáticos (125,132). Un alto porcentaje de nevus displásicos (80-100%)(87,125,133,134), nevus de Spitz (85-100%)(86,125,135), nevus azul (85-100%)(136,137) y nevus congénitos (60-85%)(86,136) expresan HMB45. Es importante mencionar que, en general, en la mayoría de los nevus, la positividad para HMB45 se localiza en la región superior de la lesión

(dermis papilar) o en la dermis adyacente a los anejos cutáneos, mientras que las células localizadas en la dermis profunda no tiñen con el anticuerpo (130). El porcentaje de positividad para HMB45 en melanomas varía según las series, detectándose entre un 73% a 100% en melanomas primarios (105,108,113,132,138) y de 58% a 95% en metastásicos (89,90,105,106,108–110,113,114,125,132,138). En una revisión que recoge los datos publicados en 866 casos de metástasis de 13 estudios se obtiene una media de positividad del 83% (89,90,105,106,108–110,113,114,125,132,138). Los melanomas con morfología epitelioides son los más reactivos, sin embargo los fusocelulares, sobre todo los desmoplásicos son habitualmente negativos (109,116,139).

En una revisión que recoge 160 casos de melanoma desmoplásico, publicados en 11 series solo un 9% son positivos, y de forma focal (89,105,109,113,116–118,140–143).

Se observa positividad para HMB45 en sarcomas de células claras, tumores de células epiteliales perivasculares (PEComas)(144–147), algunos tumores ováricos (148) y varios tumores pigmentados de origen neuroectodérmico, como el schwannoma melanótico y el tumor neuroectodérmico pigmentado de la infancia y el carcinoma de células renales con traslocación $t(6,11)(p21;q12)$ (149). En la década de los 80 se publicaron estudios en los que se observaba reactividad para HMB45 en feocromocitomas (150) y algunos carcinomas, pero en los primeros no se ha podido confirmar en estudios sucesivos y en los segundos se observó que fue resultado de contaminación de la muestra (151–156).

La literatura publicada hasta el momento indica que tumores de estirpe epitelial, mesenquimal, linfóide y glial son HMB45 negativos (98).

P16 es la proteína codificada por el gen supresor de tumores CDKN2A, también conocido como MST1 (multiple supresor tumors 1) y p16INK4A, situado en el cromosoma 9p21, que actúa como inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina. Frena el ciclo celular mediante la inactivación de la función de los complejos cdk4- y cdk6-ciclina D. Estos complejos regulan el punto de control de la fase G1 del ciclo celular mediante la fosforilación y la subsiguiente inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb), lo cual libera el factor de transcripción E2F y permite a la célula entrar en la fase S. La pérdida de función de p16 genera una inactivación de Rb por hiperfosforilación y, por tanto, una disregulación y progresión prematura del ciclo celular (157,158).

La mayoría de los nevus, independientemente de su localización (piel o ganglios) muestran expresión de p16. Sin embargo, la mayoría de las células de metástasis de melanoma pierden la expresión nuclear para p16. En los melanocitos benignos lo más frecuente es observar captación fuerte tanto nuclear como citoplásmica, mientras que en los melanomas esta captación suele ser negativa (67,159–163). Mutaciones en el gen CDKN2A están implicadas en un amplio número de tumores, entre ellos cáncer de páncreas, pulmón, mama, sistema nervioso central y leucemia linfoblástica aguda (164–166).

En los carcinomas de cérvix uterinos y en sus lesiones precursoras se ha demostrado que la positividad con la tinción para p16 se relaciona con la existencia de VPH de alto riesgo de oncogenicidad (como los subtipos 16, 18, 33, 35). Algo similar ocurriría en los carcinomas epidermoides del área genital (vulva, pene, periné). En el área extragenital la tinción para p16 sería positiva en el 80-90% de los carcinomas intraepidérmicos tipo Enfermedad de Bowen; también se ha descrito positividad con la tinción para p16 (en porcentajes mucho menores) en queratosis actínicas y en carcinomas epidermoides invasores, aunque los diversos estudios presentan resultados muy variables e incluso contradictorios (167,168).

SOX10 es un factor de transcripción de la cresta neural que parece ser crucial para la diferenciación, maduración y mantenimiento de estas células pluripotenciales hacia la formación de células de Schwann y de melanocitos. El anticuerpo anti-Sox-10 se expresa en todo tipo de neoplasias melanocíticas benignas y malignas, pero también en las neoplasias de células de Schwann, como el schwannoma, el neurofibroma y los tumores malignos de la vaina del nervio periférico, y en las células neoplásicas de otros tumores neuroectodérmicos como el ganglioneuroma, el neuroblastoma, el sarcoma de Ewing, el oligodendroglioma, el meduloblastoma o el astrocitoma. Además también se observa expresión de Sox-10 en las células mioepiteliales y sus proliferaciones neoplásicas. Su patrón de expresión es nuclear, lo que hace que sea más fácil su interpretación que la inmunotinción con proteína S-100, Melan A o HMB-45. Además de su gran sensibilidad, resulta más específico que la proteína S-100 como marcador de melanocitos, ya que algunos melanomas desmoplásicos negativos para la proteína S-100 son Sox-10 positivos. (80- 100%)(92,169–171).

La tirosinasa es una enzima clave en la síntesis de melanina, cataliza la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) y DOPA en dopaquinona. El anticuerpo monoclonal frente a tirosinasa es inmunorreactivo frente a melanocitos. Se expresa tanto en nevus como en melanoma, por lo que no es útil para diferenciarlos. Muy sensible y específico para melanoma, aunque disminuye su expresión en estadios avanzados y sólo un 6% de melanomas desmoplásicos son positivos. Menos sensible para nevus. Su patrón de expresión es citoplásmico (35,116).

Ki67/Mib-1 es un marcador muy utilizado para valorar el índice de proliferación, se suele observar en menos del 5% de células de nevus y en más del 5% de células en melanomas, sobre todo en el componente dérmico profundo; puede ser positivo débil en nevus compuesto (zona juntural) y en la fase de crecimiento radial del melanoma. Es menos valorable si hay pocas células, como puede ocurrir en las micrometástasis. Su patrón de expresión es nuclear (162,172,173).

Microphthalmia transcription factor (MiTF) es una proteína nuclear reguladora de la transcripción del gen de la tirosinasa. Muy sensible aunque menos específica de lesión melanocítica, sin diferenciar transformación maligna y con excepción del melanoma desmoplásico que es negativo para MiTF. Suele ser positivo en melanomas que son HMB45 y S100 negativos. Su patrón de expresión es nuclear (116,122).

Reticulina; Algunos estudios han observado que se dispone en melanomas envolviendo grupos de células mientras que en los nevus se encuentra rodeando células individuales (174,175).

La nestina es un marcador de células madre neurales. Suele ser positivo de forma fuerte y difusa en melanoma y negativo en la mayoría de los nevus (176,177). Algunos estudios han publicado expresión de ciclooxigenasa 2 aberrante (COX2) en melanoma, mientras que en nevus es negativa, aunque en otros estudios los datos son contradictorios (177).

DEK es una oncoproteína codificada por el oncogén *DEK*, localizado en el cromosoma 6p (178). Originariamente se describió en las LMA con la traslocación cromosómica t(6;9)(p23;q34 (179,180) y se denominó así de acuerdo a las iniciales del

primer paciente donde se describió (D.K.)(180); posteriormente se ha hallado sobreexpresión de DEK independientemente de esta traslocación, en otros tumores, como el melanoma (181). Amplificaciones focales del locus de DEK se han descrito en el retinoblastoma, en el cáncer de vejiga, colon, mama, ovario, en el carcinoma neuroendocrino de pulmón (179,180,182–187), y más recientemente en el melanoma (181).

Es posible que la sobreexpresión de DEK esté mediada por la ganancia en el brazo corto del cromosoma 6 (186,188), una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en el melanoma y también es posible que dicha sobreexpresión sea independiente de alteraciones cromosómicas, mediada por la disregulación del factor de transcripción E2F (186).

Aunque su función precisa no está clara, DEK se ha implicado en numerosos procesos celulares participando en la fosforilación, acetilación y poli-ADP ribosilación (189,190):

- Procesamiento mRNA
- Señalización célula-célula
- Reparación de DNA dañado
- Regulación de la transcripción
- Modificación de la arquitectura de la cromatina

A su vez, se ha descrito el papel de DEK en la tumorigénesis mediante principalmente los mecanismos de inhibición de la senescencia celular e inhibición de la apoptosis celular (186,191–196) y en concreto se han observado estos mecanismos en el melanoma (136). De forma específica, la sobreexpresión de DEK aumenta la resistencia a quimioterapia en el melanoma mediante la expresión a nivel transcripcional del gen *mcl-1* e inhibición de la senescencia celular en las metástasis de melanoma (186,190).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha observado que la positividad es débil para DEK en melanoma *in situ* y la positividad es más fuerte en melanomas superficiales que en melanoma *in situ*, correlacionándose los niveles de DEK con la capacidad de invasión (181). Es posible que la sobreexpresión de DEK se inicie cuando ocurre la fase de crecimiento vertical del melanoma y continúe incrementándose hasta llegar a una meseta en los melanomas profundos. Esto apoya la correlación de los niveles de DEK con la progresión del melanoma, suponiendo un factor de mal pronóstico (181).

En cuanto a la expresión de DEK en lesiones melanocíticas, el número de publicaciones en la literatura es escaso. En los estudios publicados hasta el momento, en la mayoría de nevus comunes, nevus displásicos y nevus de Spitz se ha observado que DEK es negativo o débilmente positivo (181,197); aunque en un estudio publicado por Kappes (197) se observó expresión de DEK moderada o fuerte en 4 lesiones melanocíticas benignas (3 nevus comunes y 1 Spitz) de 49 (8%). En el melanoma in situ DEK es negativo o débilmente positivo y en melanomas invasores es moderado o fuertemente positivo (181). Además, en el estudio antes citado, observan que cuando DEK es positivo en nevus, lo es sobre todo en el componente más superficial del mismo y sin embargo en el melanoma la expresión es homogénea sin estratificación (197)

Su patrón de expresión es nuclear. En la figura 1.3. se muestra la expresión de DEK en lesiones melanocíticas. Se ha observado que la intensidad con la que los melanocitos se marcan con DEK podría correlacionarse en la mayoría de los casos con la malignidad y la capacidad de invasión de la lesión melanocítica (181). Un estudio reciente ha demostrado cómo niveles altos de expresión de DEK en melanoma se correlaciona con una menor supervivencia a 10 años, mayor tasa de metástasis viscerales y de metástasis en tránsito (181).

Se ha descrito presencia e intensidad moderada de DEK en linfocitos de la dermis, queratinocitos basales de epidermis y epitelio folicular (197). Se ha descrito sobreexpresión de DEK en múltiples neoplasias como por ejemplo: carcinomas neuroendocrinos de pulmón y próstata (asociado además con peor pronóstico), carcinomas escamosos de cabeza y cuello, cáncer de mama, glioblastoma, retinoblastoma, carcinoma hepatocelular, linfoma y leucemia mieloide aguda, tumores serosos de ovario, cáncer de cérvix y cáncer de colon, entre otros (187,198–203).

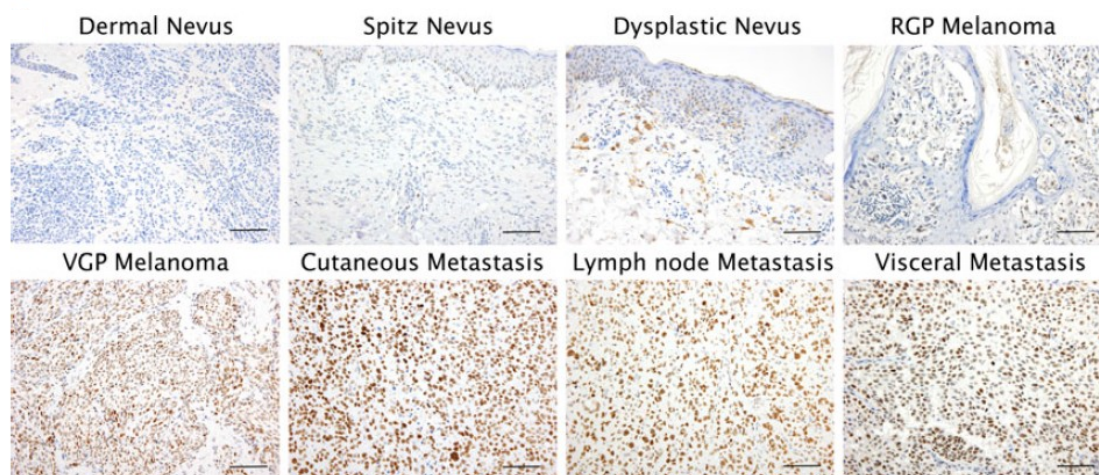


Figura 1.3. Expresión de DEK en lesiones melanocíticas. Se observa el aumento de la expresión de DEK de acuerdo a la progresión del melanoma. (Modificado de Riveiro-Falkenbach, E. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017. 30;194-202)

P62 fue descrito por Joung y colaboradores en 1996, como una proteína de 62kDa con capacidad para unirse a p56 (204). Independientemente, en 1997, Puls y colaboradores identificaron a p62 como una proteína citoplasmática capaz de interactuar con protein kinasa C atípica (205). Actualmente, p62 es también conocida como Sequestosome1 por su capacidad para secuestrar agregados de proteínas dentro del citoplasma (206). El gen Sequestosome1 (*SQSTM1*) se localiza en el cromosoma 5q.35; codifica principalmente 2 isoformas proteicas, compuestas por 440 y 356 aminoácidos. La principal isoforma identificada tiene un peso molecular alrededor de 62 kDa (204).

Las funciones de p62 se relacionan principalmente con dos grupos de procesos:

- Por un lado favorece la progresión tumoral por interacción con los sistemas de degradación y eliminación de proteínas defectuosas; mediante interacción con el sistema de ubiquitin-proteosomas y por su papel en los procesos catabólicos de autofagia (207–210).
- Por otro lado también contribuye a la tumorigénesis por interacción y regulación de múltiples vías de señalización celular, como la vía NF- κ B, que interviene en la inflamación, desarrollo embrionario, apoptosis, ciclo celular y oncogénesis (211); a través de la interacción con diferentes proteínas de la vía NF- κ B, (como aPKC, RIP1 y TRAF6) p62 se ha asociado con la regulación de la osteoclastogénesis (212), inflamación (213,214) y tumorigénesis (215). P62 interactúa con la vía Keap1-Nrf2, que

está relacionada con el estrés oxidativo, de forma que aporta resistencia a las células tumorales frente al estrés oxidativo, lo que favorece la progresión tumoral, la vía mTOR, que interviene en el crecimiento celular y el metabolismo (216).

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que p62 es indetectable en nevos comunes y expresión baja en un tercio de los nevos displásicos. En melanoma mostró positividad para p62, además con un aumento de intensidad en relación directa con el grado de invasión, de forma que los melanomas en fase de crecimiento vertical y las metástasis mostraban mayor expresión de p62 que los melanomas en estadios iniciales.

También se ha observado que el patrón de expresión es diferente en lesiones melanocíticas benignas y malignas. Las células de melanoma muestran captación de p62 en forma de agregados citoplasmáticos mientras que en las células benignas se observa una captación débil y difusa. En la figura 1.4. se muestra la expresión de p62 en tumores melanocíticos. También en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha demostrado mediante estudios *in vitro* y mediante un análisis multivariante en más de 100 pacientes que la expresión de p62 se asocia a mayor riesgo de enfermedad metastásica, siendo un factor pronóstico independiente.

Asimismo, la presencia de agregados citoplasmáticos de p62 ha sido descrita en diferentes tipos de células y enfermedades, como enfermedades neurodegenerativas, hepatitis, miositis y en otros tipos de cáncer, como mama y próstata (215,217,218)

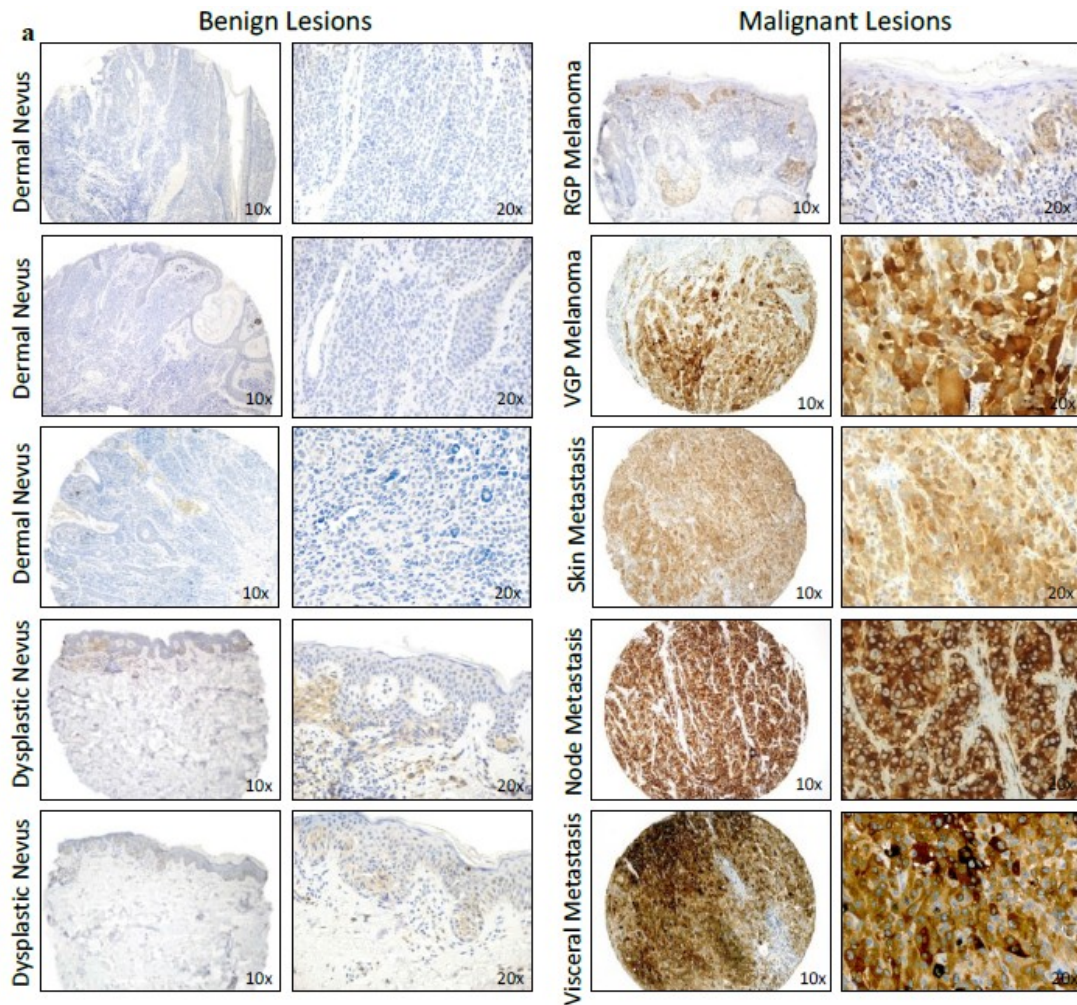


Figura 1.4. Expresión de p62 en lesiones melanocíticas. Imágenes representativas de IHQ con p62 en tissue microarrays de las lesiones melanocíticas referidas. La expresión aumenta paralelamente a la progresión del melanoma. (Modificado de Tesis doctoral Erica Riveiro, Madrid 2013.)

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

La afectación ganglionar locorregional es, junto con el espesor de Breslow, el principal factor pronóstico en pacientes con melanoma en estadio clínico localizado (estadios I y II de la AJCC).

Desde su introducción en 1992(1,2), la BSGC se ha establecido como principal técnica diagnóstica para valorar la afectación ganglionar y realizar la estadificación locorregional en estos pacientes. A pesar de ser un método poco invasivo no está exento de complicaciones, principalmente locales como seroma, hematoma e infección de la

herida quirúrgica y, más raramente, linfedema; en muchos casos los pacientes deben someterse a una anestesia general, con los riesgos que supone.

Por ello, la tendencia es a buscar técnicas diagnósticas microinvasivas y se han publicado múltiples trabajos evaluando el papel de la ecografía tradicional, ecografía de alta resolución, ecografía asociada a la punción aspiración con aguja fina o biopsia con aguja gruesa, la ecografía con contraste y PET/TC como técnicas de estadificación, con resultados diversos (40,42–55).

La ecografía ganglionar asociada a biopsia ecoguiada es una técnica mínimamente invasiva, con una baja tasa de complicaciones, un coste aceptable y accesible para la mayoría de los hospitales, aunque en los estudios publicados las cifras de efectividad de la prueba son muy variables(40,45,50,53). Por estos motivos nos pareció muy interesante conocer la utilidad de la ecografía con biopsia ecoguiada en nuestros pacientes.

Por otra parte, cuando se realiza el estudio diagnóstico del ganglio centinela, uno de los principales hallazgos que nos puede llevar a un error diagnóstico por su confusión con metástasis de melanoma, es la presencia de lesiones melanocíticas benignas (nevus ganglionares), siendo fundamental para el pronóstico y tratamiento del paciente.

Sin embargo, no existe en la actualidad un marcador o algoritmo diagnóstico perfecto que discrimine el 100% de los casos de nevus de melanoma. Esto nos motivó a completar el trabajo estudiando nuevos marcadores para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas ganglionares.

Tras revisar la literatura, dos nuevos marcadores habían obtenido muy buenos resultados para diferenciar lesiones melanocíticas benignas de malignas a nivel cutáneo, DEK y p62, por lo que quisimos estudiar si estos resultados se podían extrapolar a los ganglios linfáticos y auxiliar el diagnóstico diferencial entre nevus ganglionar y metástasis de melanoma.

2.2. Hipótesis

La ecografía con biopsia ecoguiada como método diagnóstico de estadificación en pacientes con melanoma, permite detectar metástasis ganglionares antes de la realización de la biopsia del ganglio centinela y por ello disminuye el número de intervenciones quirúrgicas a las que se someten los pacientes. Por otra parte, en el

diagnóstico histopatológico del ganglio centinela, DEK y p62 son dos nuevos marcadores que auxilian el diagnóstico diferencial entre metástasis de melanoma y nevus ganglionar.

2.3. Objetivos_

1- Evaluar la utilidad de la ecografía y de la biopsia ecoguiada en los casos que lo precisen, como métodos diagnósticos de estadificación previos a la realización de la BSGC, enfocado a valorar el porcentaje de casos en los que evita la realización de la BSGC en pacientes con melanoma.

2- Estudiar dos nuevos marcadores inmunohistoquímicos, p62 y DEK, en ganglios linfáticos para el diagnóstico diferencial entre nevus ganglionar y metástasis de melanoma.

3- Valorar la utilidad de otros marcadores, Melan A, HMB45 y p16, para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos.

4- Analizar el patrón de tinción con reticulina en lesiones melanocíticas ganglionares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Papel de la ecografía ganglionar como método de estadificación en pacientes con melanoma previo a la biopsia del ganglio centinela

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo a partir de los datos recogidos en la base de datos de melanoma del Instituto Valenciano de Oncología.

3.1.1 Pacientes

Se recogieron de forma retrospectiva todos los pacientes con melanoma cutáneo primario (estadios I y II de la AJCC) a los que se le había realizado ecografía ganglionar previa a la BSGC como parte del estudio de estadificación, desde el 1 de enero de 2004 hasta el 31 de diciembre de 2015, en el Instituto Valenciano de Oncología. Se identificaron un total de 415 pacientes.

En el Instituto Valenciano de Oncología, se seleccionaba para BSGC a aquellos pacientes con melanomas de más de 0,75 mm o de menor espesor que presentaran al menos alguno de los siguientes factores de riesgo: ulceración, al menos una mitosis/mm², satelitosis microscópica/invasión vascular, regresión mayor del 50% o extirpación incompleta con margen profundo afecto(219,220) y que tuvieran evidencia clínica y radiológica de enfermedad localizada (estadios clínicos I y II de la AJCC)

Se excluyeron los siguientes pacientes:

- Melanomas de mucosas, uveales y de primario desconocido.
- Aquellos en los que no había información suficiente acerca del resultado de la ecografía ganglionar, de la biopsia ecodirigida o del resultado de la BSGC (Se excluyen por tanto los pacientes en los que no se logró identificar el ganglio centinela).
- Pacientes con adenopatías clínicamente palpables patológicas confirmadas por biopsia ecodirigida.

3.1.2. Métodos

Los pacientes con melanoma cutáneo primario que cumplieran criterios de realización de BSGC, fueron evaluados previamente como parte del estudio de estadificación mediante ecografía ganglionar en modos B y doppler. Las ecografías fueron realizadas por 3 radiólogos experimentados (F.M., C.D., M.G.). Los ganglios linfáticos fueron clasificados como benignos, indeterminados o sospechosos de malignidad de acuerdo con los criterios estándar descritos (55,56).

Se clasificaron como sospechosos de malignidad aquellos ganglios que presentaron una pérdida total de ecos centrales o un aumento de tamaño con adquisición de forma redondeada. Se consideraron indeterminados aquellos ganglios con aumento de perfusión periférica, presencia de islas de baja ecogenicidad, presencia de imágenes en joroba o giba o desplazamiento de ecos centrales hacia la periferia de la lesión. Es decir, se clasificaron como sospechosos de malignidad o indeterminados aquellos que cumplieran al menos uno de los criterios descritos en cada grupo. Se clasificaron como benignos los ganglios que no presentaban ninguno de los criterios previos.

En aquellos con resultado indeterminado o sospechoso de malignidad se realizó biopsia con aguja gruesa (“tru-cut”) (BAG) guiada por ecografía. El estudio histológico de las biopsias realizadas incluyó el examen con hematoxilina-eosina y con inmunohistoquímica (S100 y melan A). En los pacientes en los que el estudio histológico de la biopsia mostró la presencia de células de melanoma, se realizó directamente una linfadenectomía terapéutica de la cuenca linfática correspondiente. En los demás casos, se procedió a la BSGC y, después, a la linfadenectomía terapéutica en los casos con células de melanoma. La técnica de evaluación del GC en el Instituto Valenciano de Oncología se ha descrito con detalle en trabajos previos(221).

En la figura 3.1.se resume de forma gráfica lo que sería un protocolo habitual de estadificación de melanoma (protocolo A) y el protocolo empleado en nuestro estudio (protocolo B)

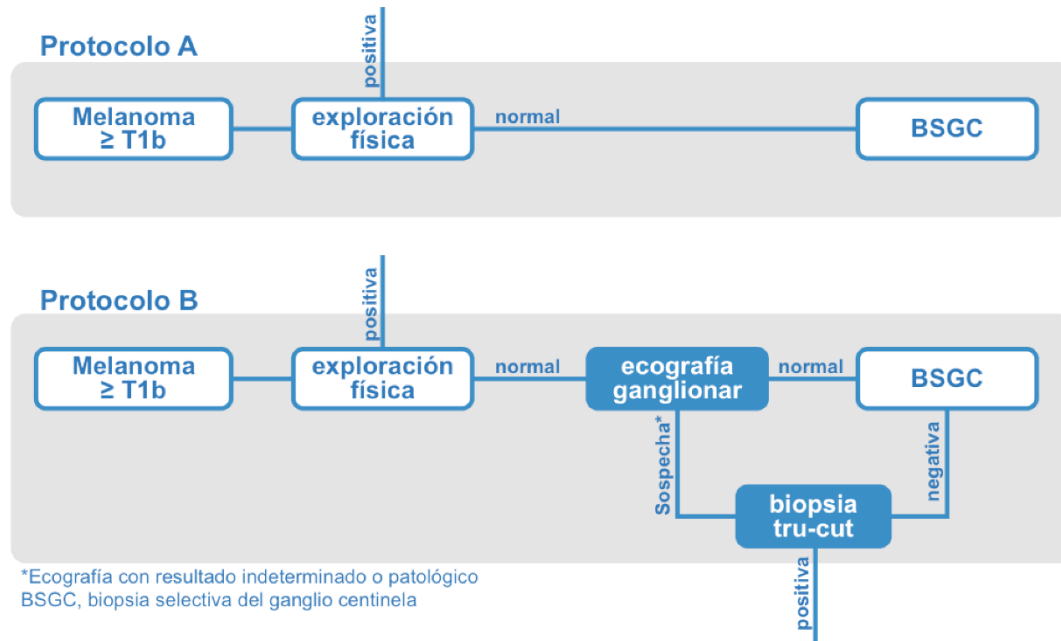


Figura 3.1. Protocolos de estadificación en melanoma. Protocolo A (protocolo habitual realizado en muchos hospitales); protocolo B (protocolo realizado en nuestro estudio).

3.1.3. Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas discretas como sería la edad, sexo, índice de Breslow, ulceración, satélites microscópica, regresión, nevus previos y localización del melanoma se utilizaron tablas de frecuencia donde se midió la frecuencia y el porcentaje de cada una.

Para las variables cualitativas nominales, como son el tener o no metástasis ganglionar, el resultado de la Ecografía ganglionar, de la biopsia o del GC, se utilizaron tablas de contingencia donde se analizaron los resultados conjuntos y se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo tanto para la capacidad de detectar metástasis de la ecografía ganglionar como de la biopsia ecodirigida.

También se utilizó un árbol de clasificación para valorar conjuntamente las variables cualitativas y comprobar si se ven afectadas por alguna variable cualitativa que pueda generar falsos negativos en el estudio.

Se utilizó el software SPSS 20.0 (SPSS, Illinois, Inc; EE.UU.)

3.2. Estudio de marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos

Se diseñó un estudio transversal con recogida de las muestras de manera retrospectiva.

3.2.1. Pacientes

Se seleccionaron de forma retrospectiva los casos existentes de nevus ganglionar procedentes del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre y hospitales colaboradores (Complejo Hospitalario de Toledo, Hospital Universitario de Salamanca, Hospital Universitario La Paz, Hospital Ramón y Cajal y Hospital Clínico Universitario de Valencia). De los casos seleccionados se valoraron las muestras teñidas con hematoxilina-eosina y se obtuvo las muestras incluidas en bloques en parafina. Se seleccionaron principalmente lesiones de difícil diagnóstico, como las compuestas por pequeños grupos de células o que no tienen un patrón de tinción inmunohistoquímico habitual.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Edad mayor o igual de 18 años.
- Existencia de material en parafina suficiente para el análisis
- Presencia de nevus ganglionar o de metástasis de melanoma, preferentemente de pequeño tamaño

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Material insuficiente para el análisis
- Presencia de nevus ganglionar o de metástasis de melanoma consistente en células aisladas, que no pudieran ser valorables en cortes de tejido sucesivos
- Metástasis de melanoma con extensa necrosis.

Se obtuvieron para el estudio IHQ un total de 79 lesiones melanocíticas de localización ganglionar, 39 benignas (nevus ganglionares) y 40 malignas (metástasis de melanoma).

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario 12 de Octubre y se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

3.2.2. Métodos

Se realizaron cortes de tejido de 4 micras de las 79 muestras ganglionares previamente fijadas en formol e incluidas en bloques en parafina y se colocaron en cristales especiales para inmunohistoquímica (DAKO, Glostrup, Alemania). Todas las tinciones fueron realizadas en la Unidad de Inmunohistoquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre. En la tabla 3.1. se detallan el clon, origen y dilución de los anticuerpos empleados para el estudio inmunohistoquímico. Las muestras teñidas fueron evaluadas a ciegas independientemente por los Doctores José Luis Rodríguez Peralto, Erica Riveiro y la doctorando Obdulia García Olmedo.

Tabla 3. Anticuerpos, clones, casa comerciales y diluciones utilizados con los 5 marcadores

Anticuerpo	Clon	Origen	Dilución
Melan A	A 103	DAKO	1:30
Melanosoma	HMB-45	DAKO	1:100
p16	E6H4	Ventana	1:2
DEK	2/DEK	BD Biosciences	1:200
p62	NBP1-49956	Novus Biologicals	1:100

3.2.2.1 Variables a estudio

3.2.2.1.1 Variables clínicas e histopatológicas

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, con el fin de extraer los datos clínicos e histopatológicos:

- Identificación del paciente
- Número de biopsia
- Sexo
- Edad al diagnóstico
- Subtipo clínico del melanoma primario

- Localización del melanoma cutáneo
- Estadío patológico al diagnóstico
- Presencia de metástasis ganglionares, al diagnóstico o durante el seguimiento
- Presencia de metástasis a distancia

Se recogieron los siguientes datos histopatológicos:

- Espesor de Breslow del tumor primario
- Nivel de Clark del tumor primario
- Localización de la lesión dentro del ganglio

3.2.2.1.2. Variables moleculares

La selección de las proteínas que se incluyeron en el estudio inmunohistoquímico, se realizó basándose en una revisión extensa y exhaustiva de la literatura, así como en la experiencia y en los trabajos previos de nuestro grupo de investigación. Se seleccionaron los siguientes anticuerpos:

- Melan A

La tinción inmunohistoquímica de Melan A se realizó en un Leica Bond-III (Leica Biosystems, Newcastle, UK) usando una dilución 1:30 procedente de anticuerpo anti-Melan A purificado de ratón (clon A 103) (Dako). Tras la incubación con anticuerpos primarios, la inmunodetección se realizó con *BondTM Polymer Refine Detection* (Leica Microsystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El sistema de score usado fue: negativo (no expresión o positividad en menos del 50% de células) o positivo (positividad mayor o igual en 50% de células), midiendo el porcentaje de células teñidas y anotando aquellos casos con intensidad fuerte y difusa.

- HMB45

La tinción inmunohistoquímica de HMB45 se realizó usando BondTM Automated System (Leica Microsystems). Tras la incubación con anticuerpos primarios, la inmunodetección se realizó con *BondTM Polymer Refine Detection* (Leica Microsystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-melanosoma (HMB45, purificado de ratón, Dako) se empleó en dilución 1:100.

La tinción fue considerada positiva para HMB45 en función del porcentaje de células que expresasen HMB45, el sistema de score usado fue: negativo (no expresión o expresión en <50% de células) o positivo (expresión en \geq 50% de células)

- P16

La tinción inmunohistoquímica de p16 se realizó usando Bond™ Automated System (Leica Microsystems). Tras la incubación con anticuerpos primarios, la inmunodetección se realizó con *Bond™ Polymer Refine Detection* (Leica Microsystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo p16 (clone E6H4 de ratón, Ventana) se empleó en dilución 1:2.

La tinción fue considerada positiva para p16 en función del porcentaje de células que expresasen p16 y la intensidad de la expresión, distinguiendo tinción nuclear y citoplásmica. El sistema de score usado fue: negativo (no expresión o expresión en <50% de células) o positivo (expresión \geq 50% de células)

- P62

La tinción inmunohistoquímica de p62 se realizó usando Bond™ Automated System (Leica Microsystems). Tras la incubación con anticuerpos primarios, la inmunodetección se realizó con *Bond™ Polymer Refine Detection* (Leica Microsystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo p62 (NBP1-49956, Novus Biologicals) se empleó en dilución 1:100.

La tinción fue considerada positiva para p62 en función del porcentaje de células que expresasen p62 y la intensidad de la expresión. El sistema de score usado fue: negativo (no expresión) o positivo (débil expresión: menos del 50% de células expresan p62 o la intensidad de la expresión es débil; o fuerte expresión: > 50% de células expresan p62 o la expresión es fuerte)

- DEK

La tinción inmunohistoquímica de DEK se realizó en un Leica Bond-III (Leica Biosystems, Newcastle, UK) usando una dilución 1:200 procedente de anticuerpo anti-DEK purificado de ratón (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) y el Leica *Bond™ Polymer Refine Kit* (pH 9.0) (Leica Biosystems).

La tinción nuclear específica fue considerada positiva para DEK en función del porcentaje de células que expresasen DEK y la intensidad de la expresión. El sistema de score usado fue: negativo (no expresión, débil positivo (<25% de las células muestran débil expresión), moderado (>25% de las células expresan DEK de forma débil o <25 % de las células muestran intensa expresión) o positivo (> 25% de las células muestran intensa expresión de DEK).

- Reticulina

Por último, se realizó un estudio valorando las características de la tinción de reticulina en nevus ganglionares y metástasis ganglionares de melanoma. Se trata de un estudio con una muestra inferior de casos, limitada por el agotamiento de la muestra tras los estudios previos. Se incluyeron en el estudio 15 casos de nevus ganglionares y 24 casos de metástasis ganglionar de melanoma. Fueron valorables para su análisis 10 casos de nevus y 22 casos de melanoma.

Se trata de una técnica de impregnación argéntica en dos tiempos que utiliza como base fuerte el hidróxido potásico y como agente reductor el formol. Las muestras teñidas con reticulina fueron evaluadas a ciegas independientemente por los Doctores José Luis Rodríguez Peralto, Erica Riveiro y la doctorando Obdulia García Olmedo. Se valoró la disposición de las fibras de reticulina, clasificando en 2 grupos: rodeando células aisladas (de 1 a 5 células) o rodeando grupos de células (más de 5 células)

3.2.3. Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo teniendo en cuenta las variables epidemiológicas (edad y sexo), clínicas (de especial relevancia en los casos de melanomas) e histopatológicas.

Posteriormente se comparó la expresión de cada marcador molecular en las diferentes lesiones melanocíticas, para establecer las diferencias significativas entre

ambos grupos, utilizando la prueba de la Ji cuadrado de Pearson. Nivel de confianza igual al 95%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Papel de la ecografía ganglionar como método de estadificación en pacientes con melanoma previo a la biopsia del ganglio centinela

Se identificaron 384 pacientes que cumplían los criterios de selección sobre los que se realizó el estudio.

Los pacientes tenían una mediana de edad al diagnóstico de 56 años. Las características clínico-patológicas de los pacientes fueron las siguientes (tabla 4)

Tabla 4. Variables de los pacientes a los que se realizó ecografía ganglionar.

VARIABLES		%
Sexo	Hombre	55,2
	Mujer	44,8
Breslow	≤2mm	60,6
	>2mm	39,4
Ulceración	No	68,7
	Si	31,3
Satelitosis microscópica	No	96,3
	Si	3,7
Regresión	No	81,6
	Si	14
	No disponible	4,3
Nevus melanocítico preexistente	No	77
	Si	20,1
	No disponible	2,9
Localización	Cabeza/cuello	12,1
	EESS	15,8
	Tronco	37,9
	EII	24,1
	Acral	10,1

4.1.1. Valoración de la ecografía como técnica de detección de ganglios metastásicos.

Los resultados se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados de la ecografía ganglionar y resultados de afectación ganglionar al completar el estudio.

ECOGRAFÍA	AFECTACIÓN GANGLIONAR	
	No	Sí
Normal	215	55

Patológica/indeterminada	67	47
a		

Del total de 384 pacientes, la ecografía fue normal en 270 pacientes, indeterminada en 97 y patológica en 17.

De los 270 pacientes donde la ecografía previa a la realización de la BSGC fue normal, el estudio histológico del ganglio centinela demostró que no existía afectación ganglionar en 215 pacientes, pero en 55 se observó metástasis de melanoma. Por otra parte, de los 114 pacientes con ecografía indeterminada o patológica, 67 pacientes no presentaron afectación ganglionar y en 47 sí se demostró metástasis.

Con estos datos obtuvimos que la ecografía como técnica de detección de ganglios metastásicos presentó una sensibilidad del 46%, una especificidad del 76%, un valor predictivo positivo del 41%, un valor predictivo negativo del 79% y una tasa de falsos negativos del 20%.

De los 97 pacientes con ecografía indeterminada, finalmente presentaron metástasis ganglionar 33 (34%).

4.1.2. Rentabilidad de la biopsia ecodirigida.

El análisis de la rentabilidad de la BAG ecodirigida mostró los resultados recogidos en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Características de los pacientes según el resultado de la ecografía ganglionar, la biopsia ecodirigida y el resultado de la BSGC.

Ecografía ganglionar			Ganglio centinela			Total
			Negativo	Positivo	No realizado	
Normal	Biopsia ecodirigida	No realizada	215	55	0	270
	Total		215	55	0	270
Indeterminada	Biopsia ecodirigida	No realizada	7	3	0	10
		Muestra insuficiente	3	0	0	3
		Linfadenitis	54	16	0	70
		Metástasis	0	0	14	14
	Total		64	19	14	97
Patológica	Biopsia ecodirigida	Muestra insuficiente	1	2	0	3

		Linfadenitis	2	3	0	5
		Metástasis	0	0	9	9
	Total		3	5	9	17
Total	Biopsia ecodirigida	No realizada	222	58	0	280
		Muestra insuficiente	4	2	0	6
		Linfadenitis	56	19	0	75
		Metástasis	0	0	23	23
	Total		282	79	23	384

Como hemos comentado en el apartado de Material & Métodos, en los 215 pacientes con ecografía ganglionar normal no se realizó la biopsia ecodirigida. De los 114 pacientes con ecografía indeterminada o patológica se realizó biopsia ecodirigida a 104. De estos 104, en los 87 pacientes con ecografía indeterminada la BAG, fue negativa en 73 (83,9%) y positiva en 14 (16,1%) (sensibilidad 42%, especificidad 84,4%). De los 17 pacientes con ecografía sospechosa de malignidad, la biopsia ecodirigida fue negativa en 8 (47%) y positiva en 9 (53%) (sensibilidad 64,3%, especificidad 37,5%). El material de biopsia fue insuficiente en 3 pacientes con ecografía indeterminada y en el mismo número de pacientes con ecografía patológica. (Figura 4.1.)

Se realizó BSGC en 361 pacientes, siendo negativa en 282 casos y positiva en 79 (en los 23 pacientes con biopsia ecodirigida con resultado de metástasis se realizó directamente linfadenectomía total).

De forma global obtuvimos una sensibilidad para la biopsia ecodirigida de 44,5%, especificidad 60,9%, valor predictivo positivo 100% y valor predictivo negativo 74,6%. De los 102 pacientes que presentaron metástasis ganglionar, un 22,5% fueron detectadas mediante la biopsia ecodirigida.

El porcentaje de ganglios positivos en cada grupo, sobre los pacientes en los que se realizó BAG y había material para su análisis fue del 16,6% (14/84) en el grupo de ecografía con resultado indeterminado y del 64% (9/14) en el grupo con ecografía patológica.

El porcentaje de ganglios centinelas positivos con BAG negativa (falsos negativos) fue del 22,8% (16/70) en el grupo de ecografía indeterminada y del 60% (3/5) en el grupo de ecografía patológica.

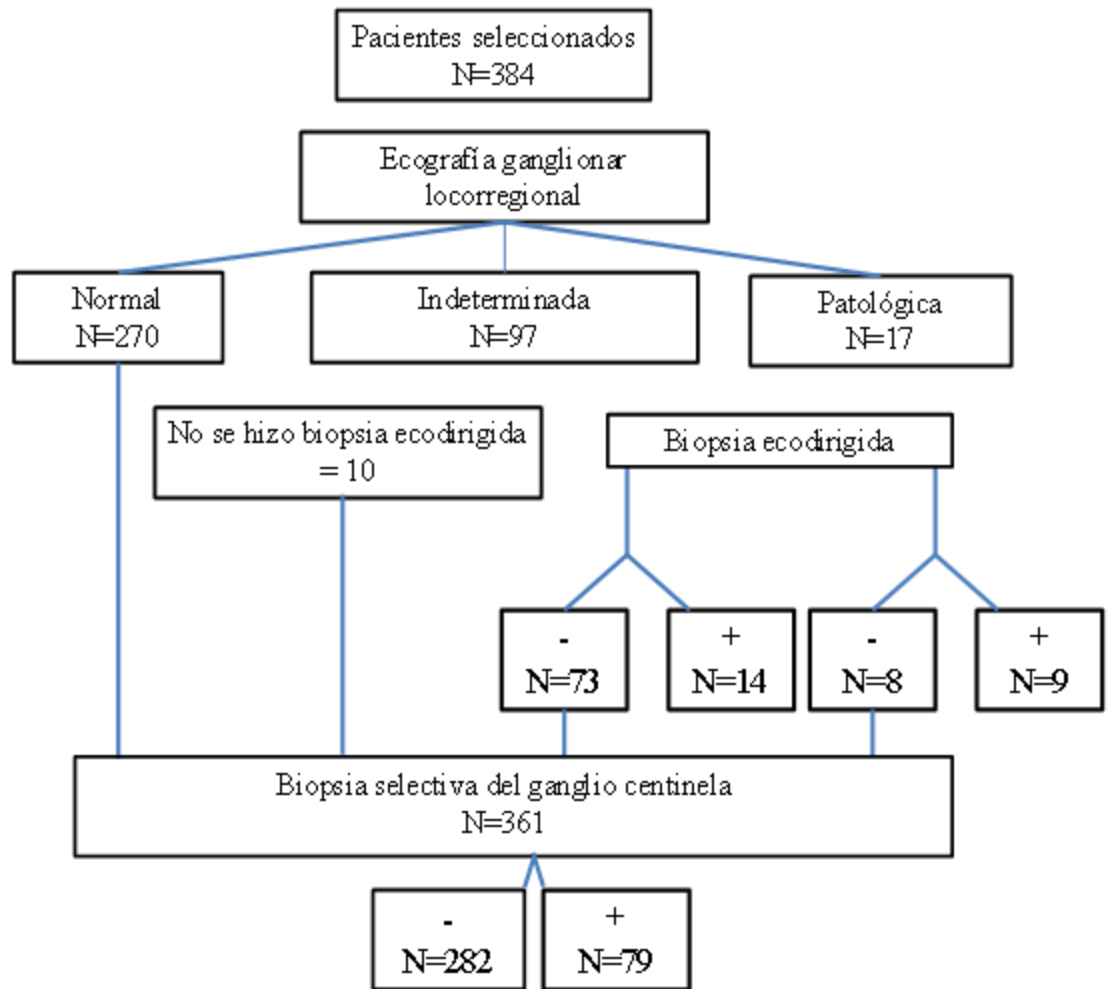


Figura 4.1. Diagrama de flujo del estudio con ecografía ganglionar y biopsia ecodirigida.

Por último, se evaluaron los factores clínico-patológicos asociados a los 55 casos que -fueron falsos negativos por la ecografía. Se observó que había un porcentaje significativamente mayor de falsos negativos en pacientes mayores de 60 años y en aquellos en los que el espesor de Breslow era menor de 2 mm. El resto de los factores estudiados no resultaron estadísticamente significativos (Figura 4.2.)

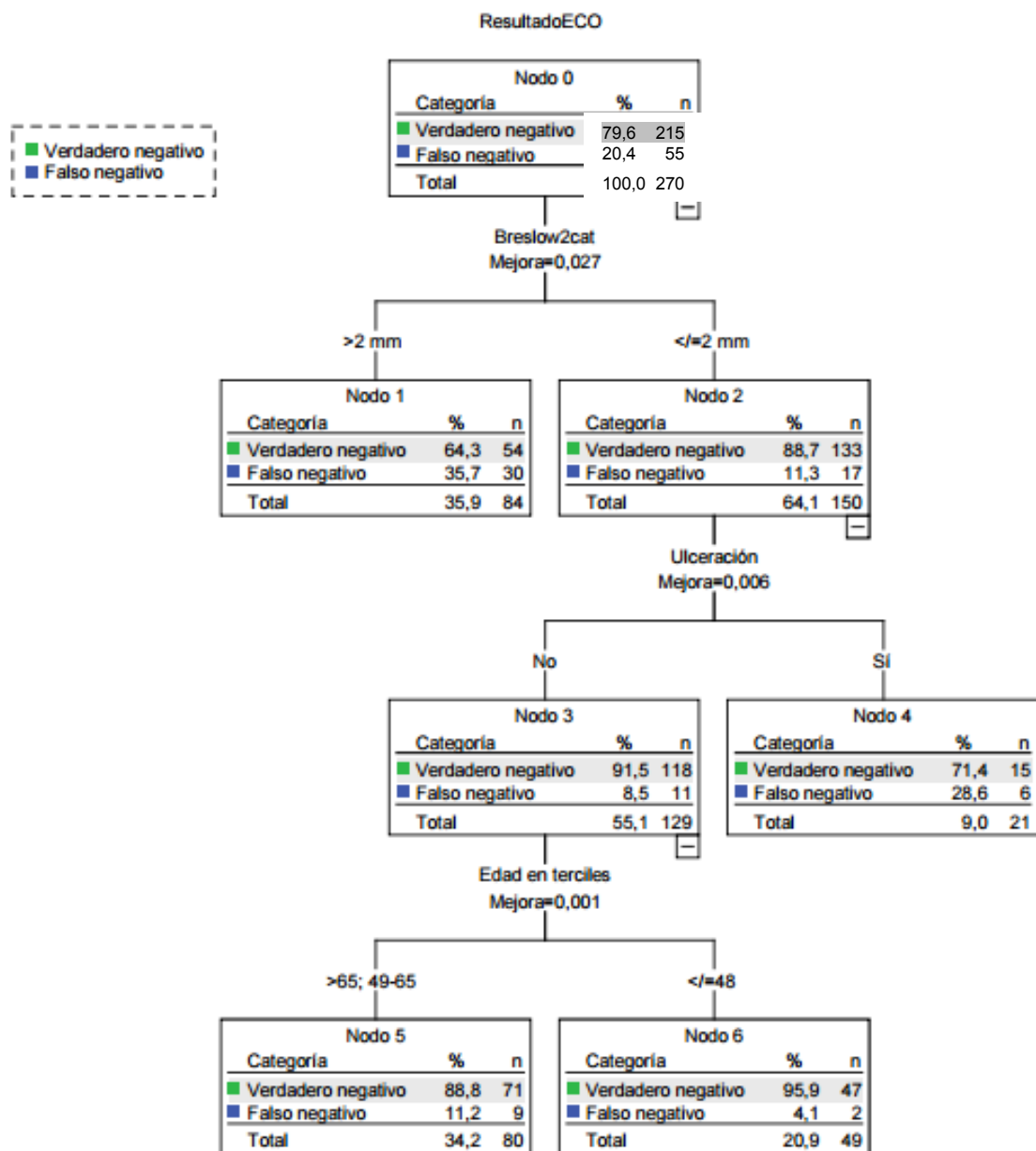


Figura 4.2. Árbol de clasificación para evaluar los falsos negativos asociados a la ecografía ganglionar (pacientes con ecografía normal y confirmación histológica de metástasis en la BSGC)

En nuestro trabajo se evitó la realización de la BSGC en 23 de 384 pacientes (6%).

4.2. Estudio de marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos

4.2.1. Características clínicas e histopatológicas

Como ya se ha comentado anteriormente, para nuestro estudio se seleccionó un total de 79 lesiones melanocíticas localizadas en ganglios linfáticos, pertenecientes a 70 pacientes. De estas, 39 casos corresponden a lesiones benignas (nevus ganglionares) y 40 malignas (metástasis ganglionares de melanoma).

Inicialmente estaban diagnosticados como 41 casos de nevus y 38 casos de metástasis de melanoma pero, tras el estudio realizado, 2 casos inicialmente diagnosticados como nevus fueron reclasificados como metástasis de melanoma. Uno de ellos se trataba de una lesión de pequeño tamaño, de localización subcapsular, que en su evolución desarrolló nuevas lesiones ganglionares compatibles con metástasis y falleció a causa del melanoma y otro con células de fenotipo balonizante, las cuales se comprobó que eran similares al melanoma primario de procedencia (Figura 4.3)

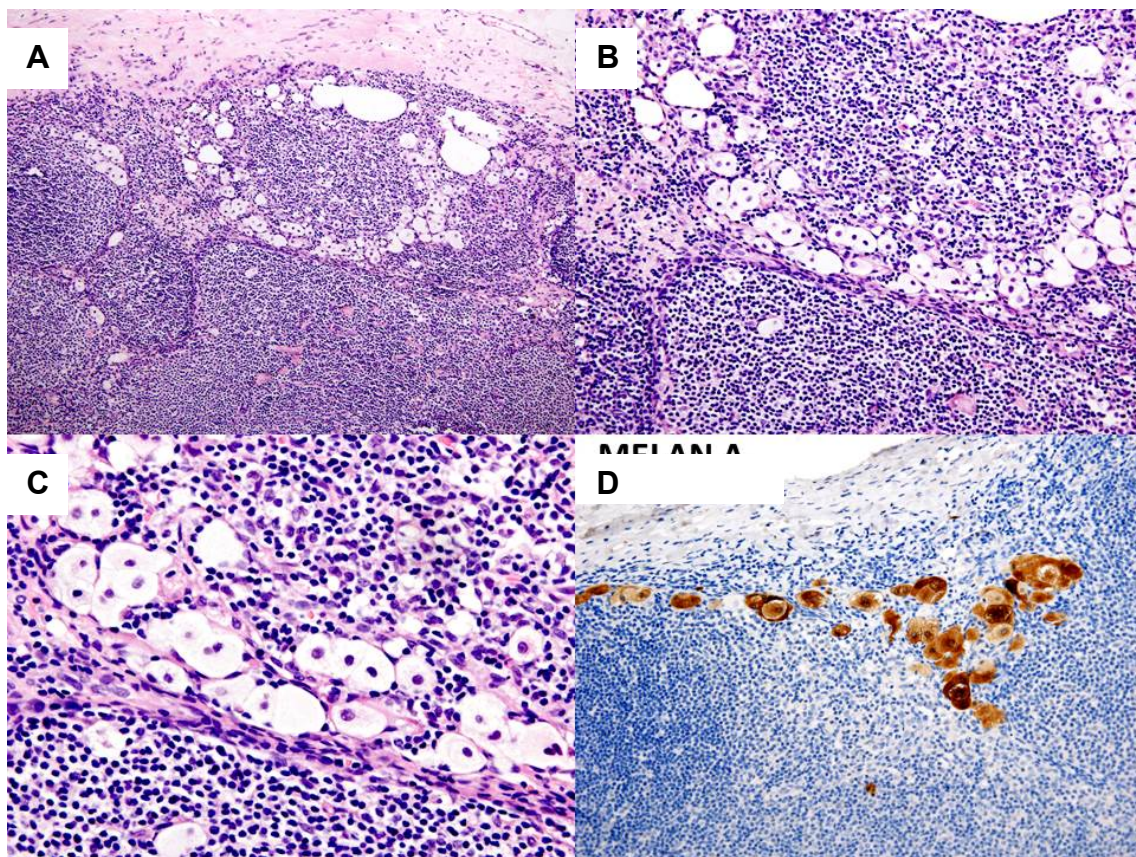


Figura 4.3 Metástasis ganglionar de melanoma de células balonizantes. Detalle del ganglio linfático donde se observa infiltración por células grandes de citoplasma claro con núcleo grande y nucleolo prominente, correspondientes a metástasis de melanoma de fenotipo balonizante. A) HE x4. B) HE x10. C) HE x20. D) Melan A x10.

En cuanto a los datos clínicos disponibles, de los nevus ganglionares la información accesible fue la de los casos procedentes del Hospital Universitario 12 de

Octubre, los 27 casos restantes proceden de hospitales colaboradores que nos aportaron las muestras en parafina, pero fue posible recapitular todos los datos clínicos.

Disponemos también de la mayoría de los datos de los pacientes con melanoma, procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre y extraídos de las historias clínicas informatizadas. Algunos datos no disponibles procedían de casos que han sido recibidos como “casos consulta” procedentes de otros hospitales, sin registrarse todos los datos clínicos.

En el Hospital de Octubre se identificaron 19 nevus ganglionares, los 19 casos de ganglios centinela de pacientes de melanoma, de un total de 542 pacientes, lo que supone una prevalencia de nevus ganglionar del 3,5%. De los 4671 pacientes a los que se realizó ganglio centinela por cáncer de mama en dicho periodo, no se documentó ningún caso de nevus ganglionar.

- Edad al diagnóstico

Se dispuso de este dato en 44 pacientes, con edades comprendidas entre 18 y 88 años, con una media de 56,8 años (Tabla 4.3.)

Tabla 4.3. Variable “edad” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos.

LESIONES MELANOCÍTICAS	RANGO DE EDAD (AÑOS)	MEDIA (AÑOS)
NEVUS GANGLIONARES	18-88 años	57,9 años
METÁSTASIS MM	21-80 años	55,7 años
TOTAL	18-88 años	56,8 años

La edad media de los pacientes fue similar en ambos grupos.

- Sexo

Se dispuso de este dato en 44 pacientes. En nuestro estudio hubo un mayor número de pacientes varones: 25 varones (56,8%) y 19 mujeres (43,2%). Sin embargo, si diferenciamos entre nevus ganglionares y metástasis de melanoma, entre los pacientes con nevus se encontró mayoría de mujeres (3 Varones (37,5%) y 5 mujeres (62,5%)) y en los pacientes con melanoma mayoría de varones (22 Varones (61,1%) / 14 mujeres (38,9%)) (Figura 4.4.).

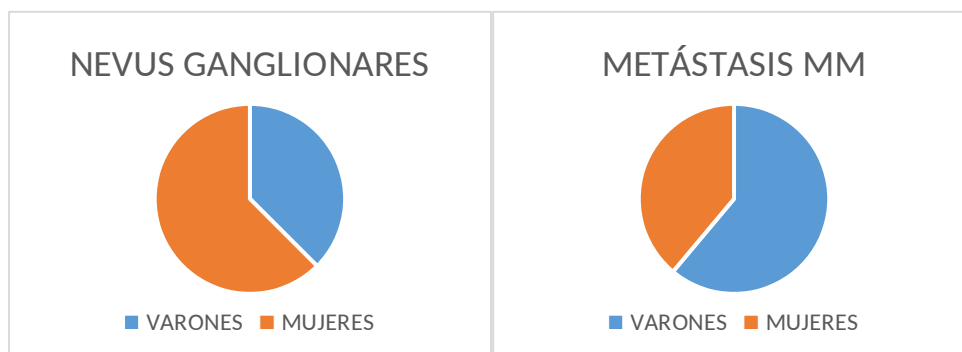


Figura 4.4. Variable “sexo” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos.

- Subtipo de melanoma

Se dispuso de este dato en 52 pacientes. El subtipo de melanoma más frecuente que motivó la realización del ganglio centinela fue en ambos casos melanoma de extensión superficial, seguido del melanoma nodular y del melanoma lentiginoso acral. En el grupo de nevus ganglionar no hubo ningún melanoma tipo lentigo maligno melanoma y en el grupo de metástasis de melanoma 1 caso (Figura 4.5.)

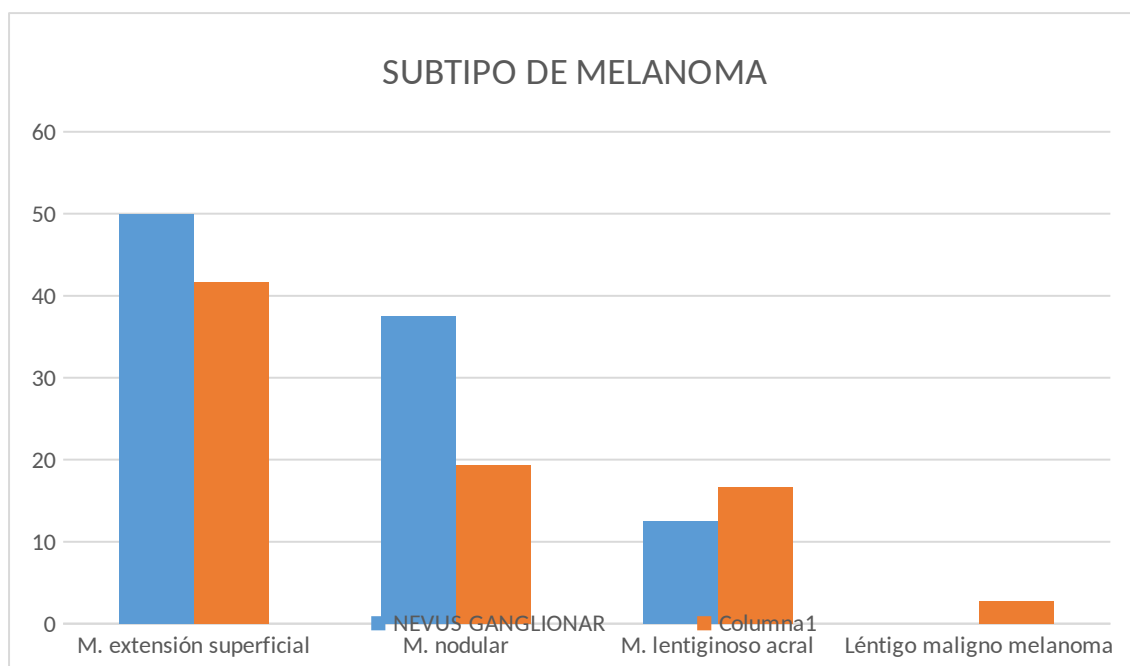


Figura 4.5. Variable “subtipo de melanoma cutáneo” en el estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos. Se representan en abscisas el subtipo de melanoma cutáneo y en ordenadas el % respecto al total, en azul los casos de nevus ganglionar y en naranja las metástasis ganglionares de melanoma.

- Localización del melanoma primario

Se dispuso de datos de 37 pacientes. La localización más frecuente de las lesiones melanocíticas fue el tronco (48,6%), con proporción similar entre la lesiones benignas (50%) y melanomas (48,6%). Las localizaciones en cabeza y cuello supusieron una media de 10,4% (12,5% en nevus y 8,3% en melanoma). En el grupo de nevus ganglionar no hubo ningún caso en extremidades superiores y en el de metástasis de melanomas un 5,5%. Se localizaron en extremidades inferiores un 35,4% de los casos (sin diferencias relevantes en ambos grupos: 37,5% en el grupo de los nevus y 35,4% en el de melanomas. (Figura 4.6.)

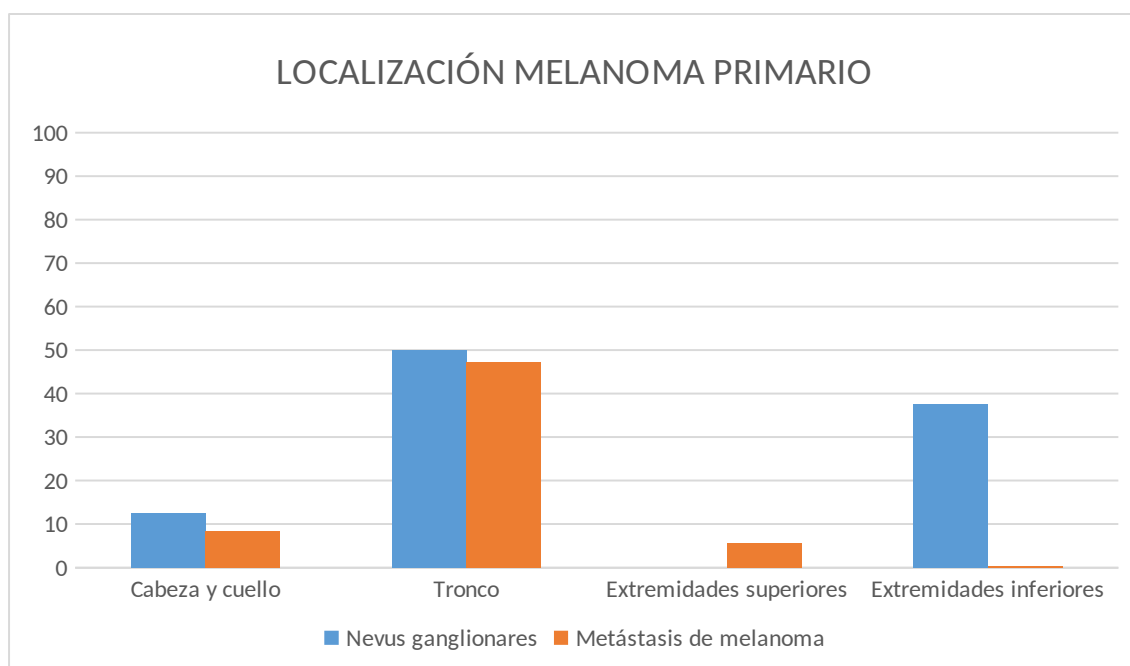


Figura 4.6. Variable “localización del melanoma cutáneo” en nevus ganglionares (azul) y metástasis de melanoma (naranja).

- Espesor de Breslow

Se dispuso de datos de 38 pacientes. La media del espesor de Breslow de todos los melanomas seleccionados fue de 5,37 mm y fue similar en ambos grupos (5,2 mm en el grupo de nevus ganglionares y 5,54 mm en el de metástasis de melanoma). En el grupo de nevus ganglionar la mayor parte de los melanomas primarios eran melanomas gruesos: el 12,5% de los melanomas primarios presentaron un espesor de Breslow < 1 mm; el 25% entre ≥ 1 mm y ≤ 4 mm; y el 62,5% de los melanomas > 4 mm. En el grupo de las metástasis de melanoma la mayor parte de los melanomas primarios presentaron un espesor intermedio: el 6,7% de los melanomas primarios presentaron un espesor de Breslow < 1 mm; el 66,7% entre ≥ 1 mm y ≤ 4 mm; y el 26,7% de los melanomas > 4 mm (Figura 4.7.).

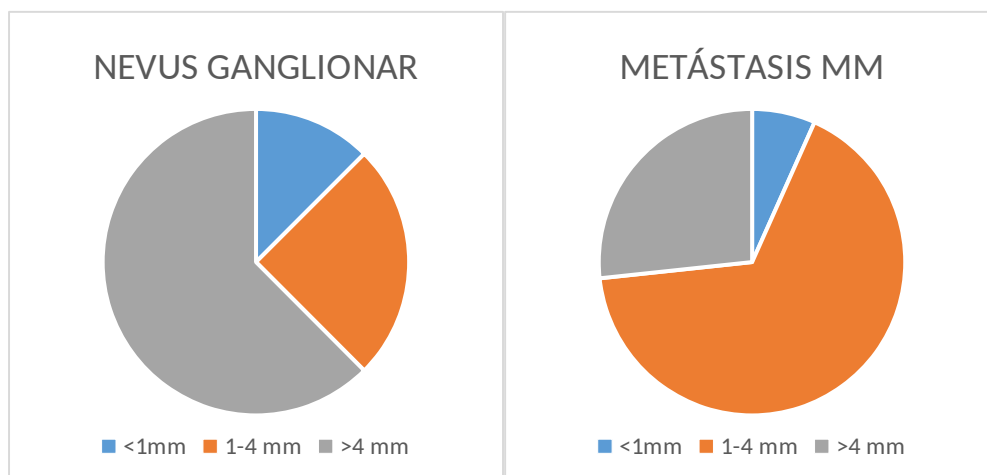


Figura 4.7. Variable “espesor de Breslow”. Se representan los valores del espesor de Breslow que tenían los melanomas cutáneos en ambos grupos.

- Nivel de Clark

Se dispuso de datos de 38 pacientes. En nuestro trabajo la mayoría de los melanomas primarios presentaron un nivel III o IV de Clark y el porcentaje fue similar en ambos grupos. En el grupo de nevus ganglionar presentaron Clark III o IV el 87,5% de pacientes y 12,5% Clark V. En el grupo de metástasis de melanoma presentaron Clark III o IV el 89,6% y Clark V el 10,4% de los casos. No hubo casos con niveles inferiores de Clark.

- Localización de lesión dentro del ganglio.

En nuestra serie, la mayoría de los nevus ganglionares se localizaron en el estroma fibroso del ganglio (cápsula o septos) y a nivel subcapsular (Figura 4.8). Se obtuvieron 5 casos de localización poco habitual: 4 casos de localización intraparenquimatosa o subcapsular con extensión intraparenquimatosa (Figuras 4.9 y 10.) y uno de localización intravascular además de intracapsular.

Las metástasis ganglionares de melanoma se localizaron de la siguiente forma: capsular 5%, subcapsular 35%, intraparenquimatoso 45% e intraparenquimatoso y sobrepasando la cápsula 13,9%. (Figuras 4.11 y 12.). Pudieron valorarse todos los casos.

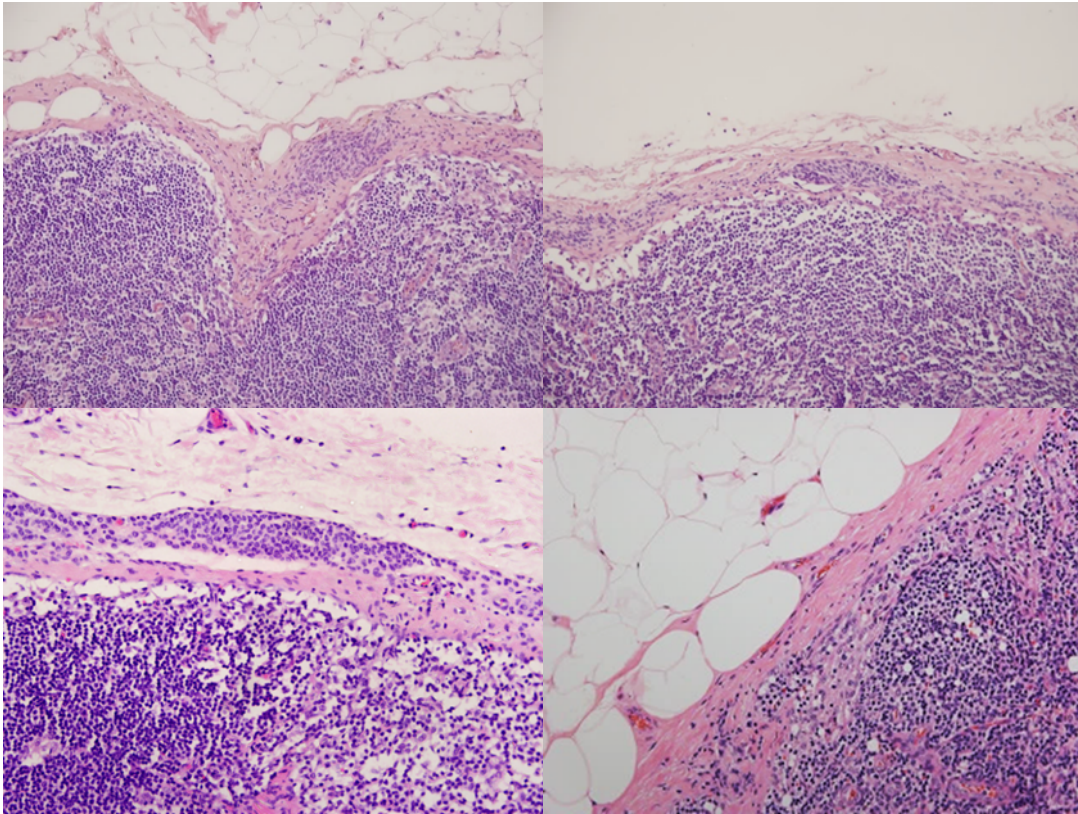


Figura 4.8. Localización de los nevus ganglionares. Muestras representativas de la localización más frecuente de los nevus melanocíticos en el ganglio linfático: Imágenes superiores e inferior izquierda localización intracapsular, imagen inferior derecha subcapsular (HE x20). Se observa que están compuestos por pequeñas agrupaciones de células névicas.

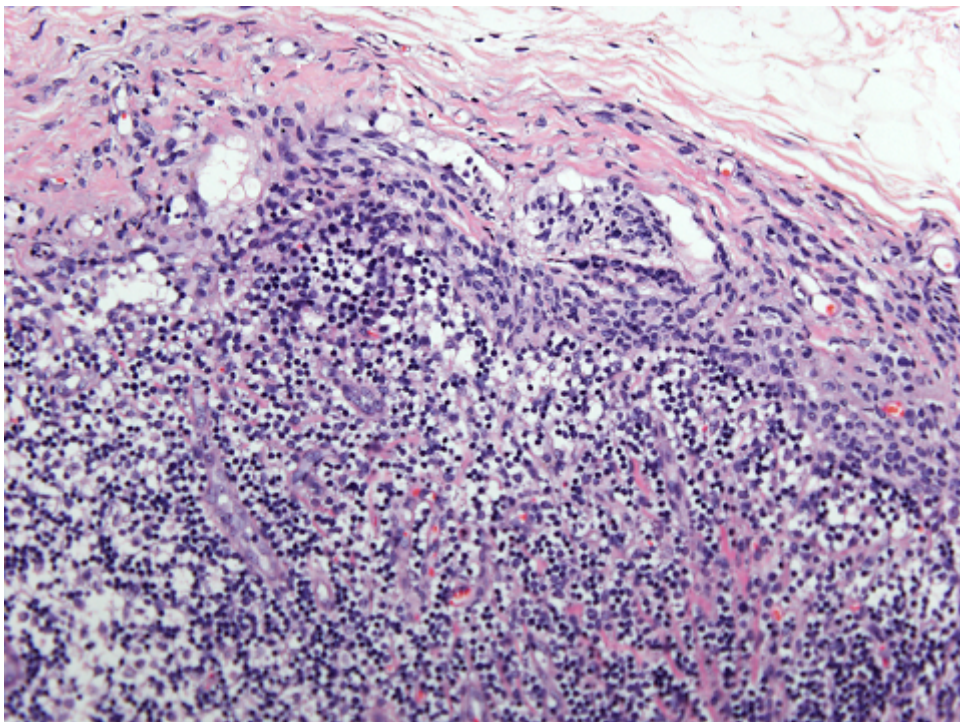


Figura 4.9. Nevus ganglionar subcapsular con extensión intraparenquimatosas. (HEx20). Se observa agrupación subcapsular de células melanocíticas sin atipia, con extensión al parénquima ganglionar.

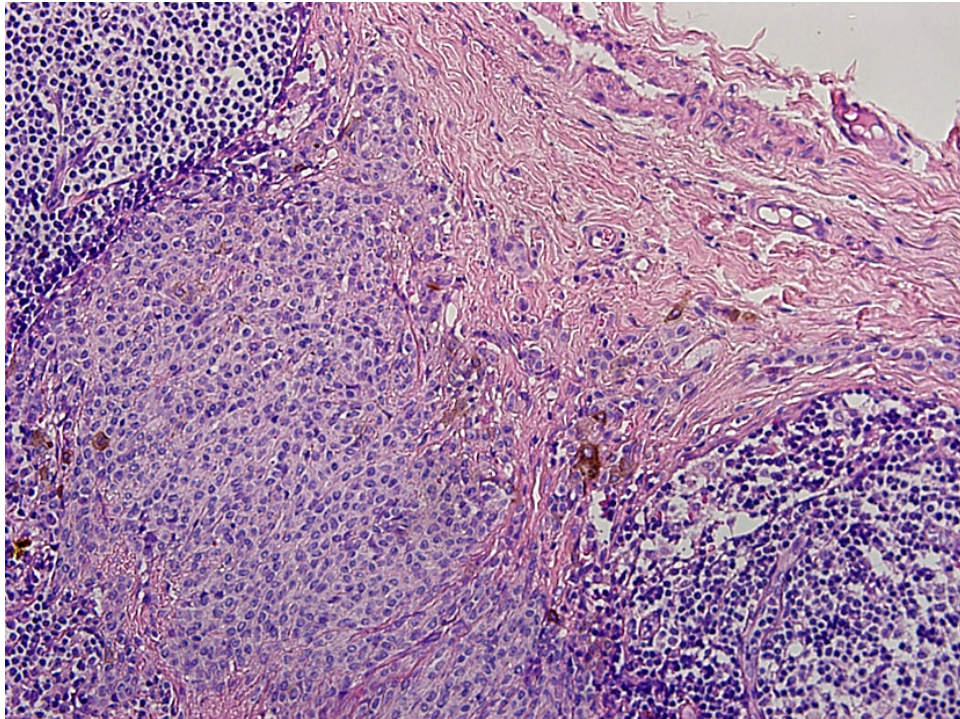


Figura 4.10. Otro de los nevos subcapsulares con extensión intraparenquimatosas (HEx20). Se observa en la zona subcapsular y con extensión hacia el parénquima una agrupación de células monomorfas, sin atipia, correspondientes a nevus ganglionar.

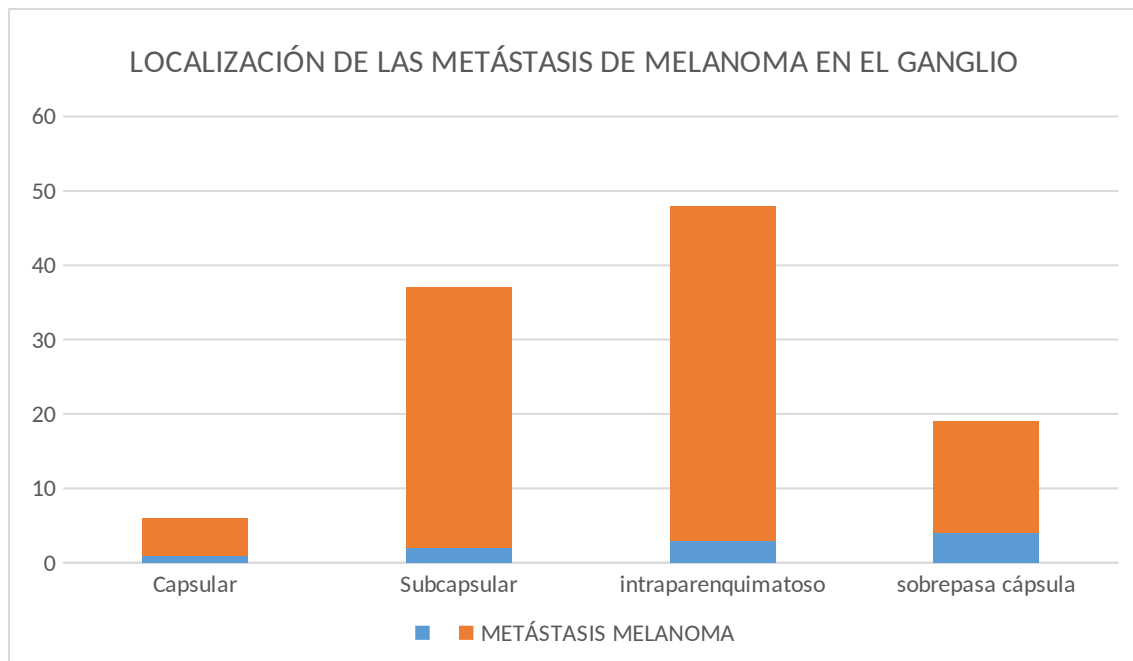


Figura 4.11. Variable “localización de las metástasis de melanoma en el ganglio”.

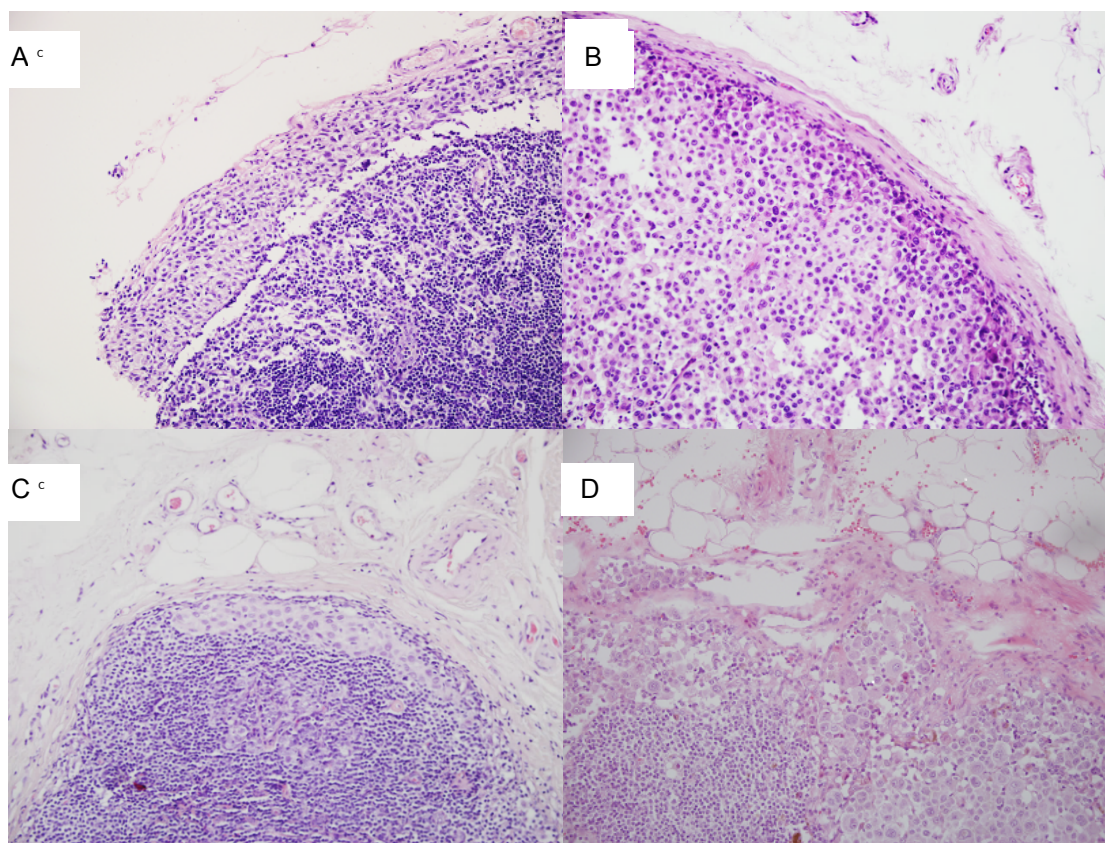


Figura 4.12. Metástasis ganglionares de melanoma de diferente localización (HEx20). A) Metástasis ganglionar de melanoma de localización intracapsular. B) Metástasis ganglionar de melanoma de localización subcapsular con extensión intraparenquimatosa. C) Metástasis ganglionar de melanoma de localización subcapsular. D) Metástasis ganglionar de melanoma de localización intraparenquimatosa.

- Procedencia del ganglio (Centinela/No centinela)

En ambos grupos, la mayoría de los ganglios eran centinela. En concreto, en el grupo de nevus ganglionares, todos procedían de ganglios centinela a excepción de 1 caso del que no se dispone el dato. En el grupo de metástasis de melanoma 25 casos (69,4%) procedían de ganglios centinela y 7 casos (19,4%) de ganglios extirpados durante la linfadenectomía; 1 caso (2,8%) procedía de un paciente que debutó con una masa inguinal y otro caso (2,8%) de un ganglio visceral pulmonar extirpado en un paciente con metástasis pulmonares (Figura 4.13.).

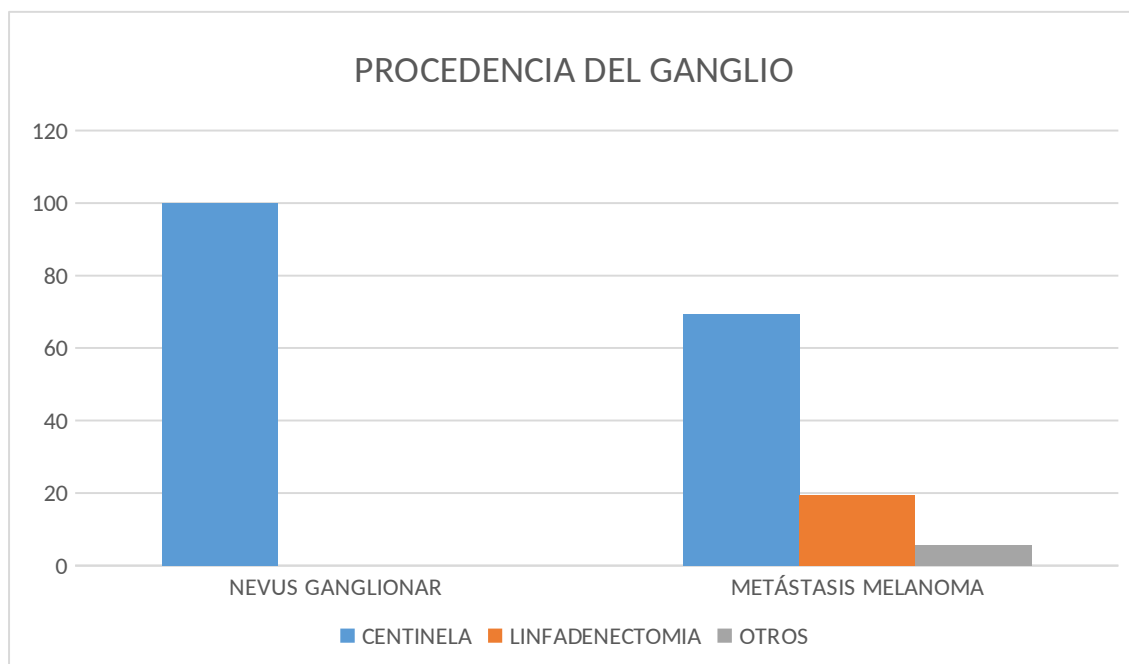


Figura 4.13. Variable “procedencia del ganglio”.

- Desarrollo de metástasis

En el grupo de nevus ganglionares, 2 pacientes presentaron metástasis ganglionar de melanoma de forma concomitante al diagnóstico del nevus ganglionar y un paciente desarrolló metástasis durante la evolución (2 años más tarde concretamente). Dos pacientes desarrollaron metástasis a distancia, falleciendo uno de ellos, a causa del melanoma; el otro paciente permanece vivo al final del seguimiento. En el grupo de metástasis ganglionar de melanoma, 2 pacientes presentaron nevus ganglionar asociado (5,5%, los mencionados en el grupo de nevus). 14 pacientes desarrollaron metástasis a distancia y fallecieron a causa de las mismas.

4.2.2. Características inmunohistoquímicas de las lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos. Estudio descriptivo y comparativo

Se analizaron 2 nuevos marcadores moleculares: DEK y p62 y se compararon con los marcadores clásicos Melan A, HMB-45 y p16, mediante técnicas de inmunohistoquímica en los cortes realizados de muestras en parafina en una serie de 79 lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos: 39 nevus ganglionares y 40 metástasis de melanoma.

En la tabla 4.4. se recoge el número de muestras interpretables de la serie para cada tipo de lesión.

Tabla 4.4. Número de muestras interpretables en cada serie.

PROTEÍNAS	NEVUS	METÁSTASIS GANGLIONAR	TOTAL
-----------	-------	-----------------------	-------

ESPECÍFICAS	GANGLIONAR	MELANOMA	
Melan A	38	40	78
HMB-45	36	40	76
p16	38	40	78
p62	38	40	78
DEK	33	39	72

El número de muestras interpretables en el caso de los nevus en algunos casos es menor. Esto en la mayoría de los casos en los que ocurre es debido a que en los cortes sucesivos se deja de ver el nevus, ya que son lesiones de pequeño tamaño. Dos casos de nevus ganglionar son de localización intraparenquimatosa y están compuestos por un grupo pequeño de células, en el primero la tinción de DEK y en el segundo DEK y p62 no son valorables porque no se visualizan en dichos cortes.

En este trabajo no se analiza la proteína S-100, a pesar de ser uno de los marcadores más sensibles para neoplasias melanocíticas, porque dado que se expresa también en las células dendríticas de los ganglios linfáticos, es menos útil para diferenciar células melanocíticas aisladas (células névicas o células de melanoma metastásico).

4.2.2.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus ganglionares

Las características inmunohistoquímicas de los nevus ganglionares se muestran a continuación resumidas en la tabla 4.5. y detalladas por caso en la tabla 4.6. En la figura 4.14. se muestra un caso típico de nevus ganglionar.

Tabla 4.5. Características IHQ resumidas de los nevus ganglionares estudiados.

MARCADORES PROTEICOS	CASOS POSITIVOS/TOTAL	% CASOS POSITIVOS
Melan A	38/38	100%
HMB-45	3/36	8,3%
p16	36/38	94,7%
p62	4/38	10,5%
DEK	1/33	3%

Los datos reflejan el número de casos positivos sobre el total de casos analizables y el porcentaje correspondiente.

Tabla 4.6. Características IHQ detalladas por caso de los nevus ganglionares estudiados.

Ganglios	Melan A	HMB45	p16	p62	DEK
1	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
2	positivo	negativo	positivo	positivo	Negativo
3	positivo	negativo	positivo	positivo	Negativo
4	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
5	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
6	positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
7	positivo	negativo	positivo	positivo	Negativo
8	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
9	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
10	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
11	positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
12	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
13	positivo	NV	positivo	negativo	Negativo
14	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
15	positivo	negativo	positivo	negativo	NV
16	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
17	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
18	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
19	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
20	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
21	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
22	positivo	negativo	positivo	negativo	NV
23	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
24	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
25	positivo	negativo	positivo	negativo	NV
26	positivo	positivo	positivo	NV	NV
27	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
28	positivo	negativo	NV	negativo	negativo
29	positivo	NV	positivo	negativo	NV
30	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
31	NV	negativo	positivo	negativo	negativo
32	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
33	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
34	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
35	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
36	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
37	positivo	negativo	positivo	negativo	NV
38	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
39	positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo

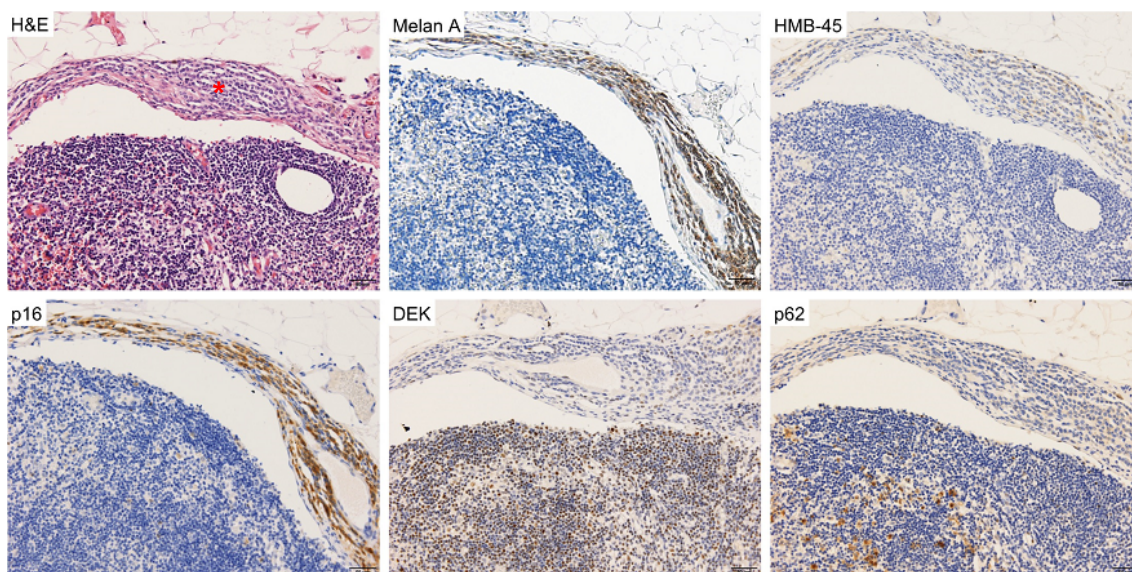


Figura 4.14. IHQ más habitual de un nevus ganglionar (x10). Con HE se observa un foco de células intracapsular (*) Estas células corresponden a un nevus ganglionar y muestran expresión de Melan A y p16, mientras que no expresan HMB45, DEK ni p62.

Melan A, marcador muy sensible y específico de lesión melanocítica, mostró altos niveles de expresión en nevus (100%), con una media de expresión en el 99,5% de las células y una desviación estándar del 2,26, rango [90-100]. Su patrón de expresión fue citoplásmico y en la mayoría de los casos tiñe de forma intensa y difusa.

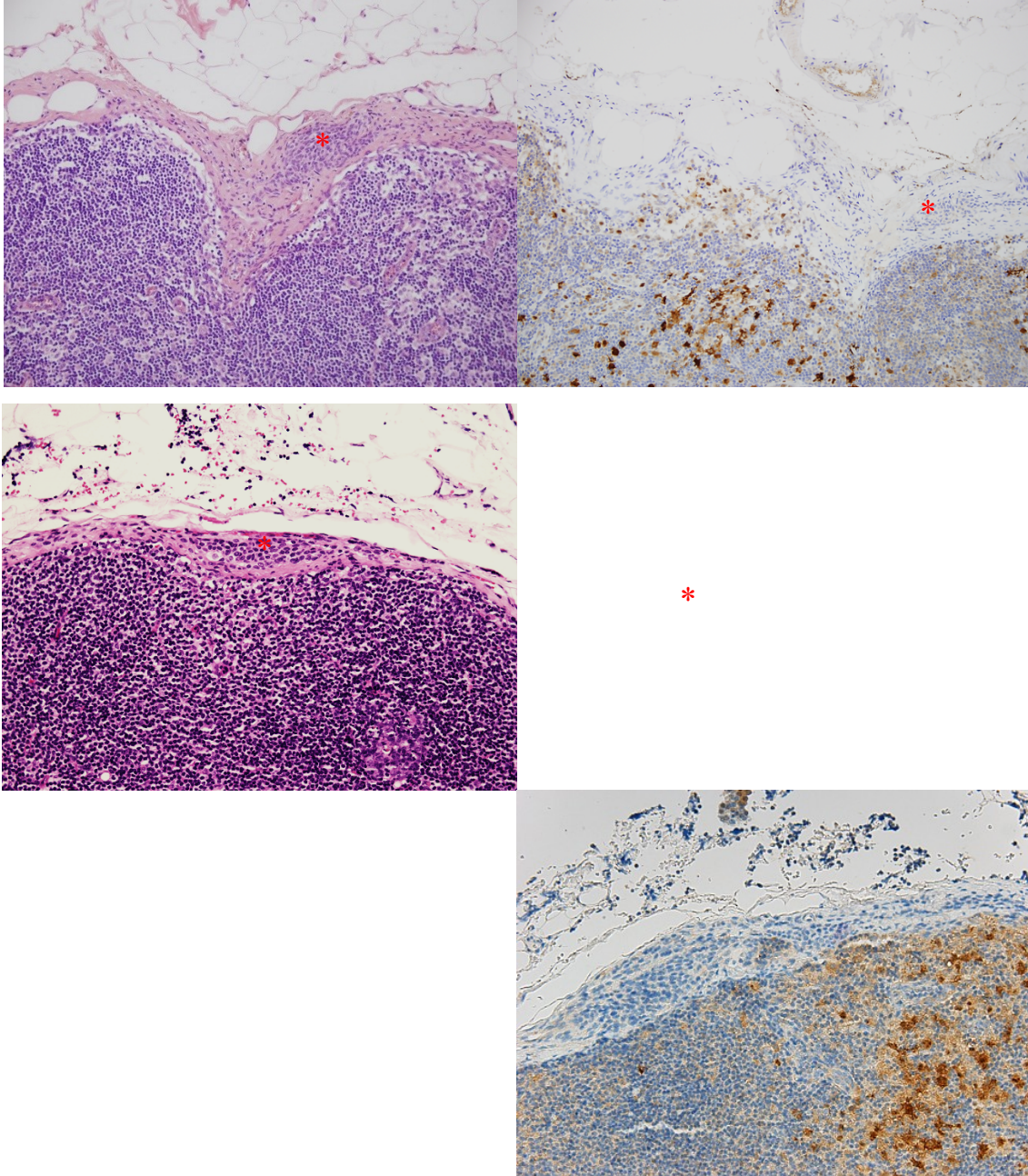
HMB-45 también es un marcador específico de lesión melanocítica, fue negativo en 33 casos de nevus (91,7%) y resultó positiva en 3 (8,3%); Obteniendo un p valor de 0,0001, por lo que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tinción con HMB-45 entre nevus y melanoma. Su patrón de expresión fue citoplásmico. En muchos de los casos de nevus la expresión de HMB-45 fue nula; sin embargo, en 5 casos (13,9%) se observó expresión débil en menos del 50% de células, considerados como negativos. Los 3 casos de nevus positivos para HMB-45 mostraron expresión intensa y en un 93,3 % de sus células (Rango 80-100).

P16 mostró altos niveles de expresión en nevus ganglionares (94,7% del total de nevus) y su patrón de expresión fue en la mayoría de los casos intenso y difuso, nuclear y citoplásmico.

P62. Los nevus ganglionares mostraron bajos niveles de expresión de p62 (Figura 4.15.) (4 casos positivos de 38, 10,5%) y de estos no hubo ningún caso con expresión intensa en más de la mitad de la lesión, dicho de otro modo, mostraron

Resultados

expresión débil o alta en menos del 50% de células. El patrón de expresión de p62 observado en los nevus ganglionares, en los casos positivos, fue citoplásmico, débil y difuso.



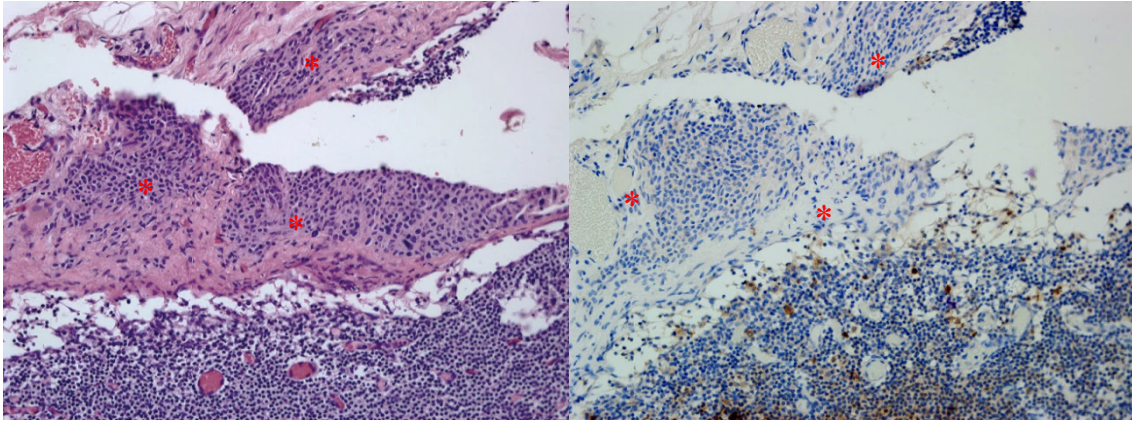
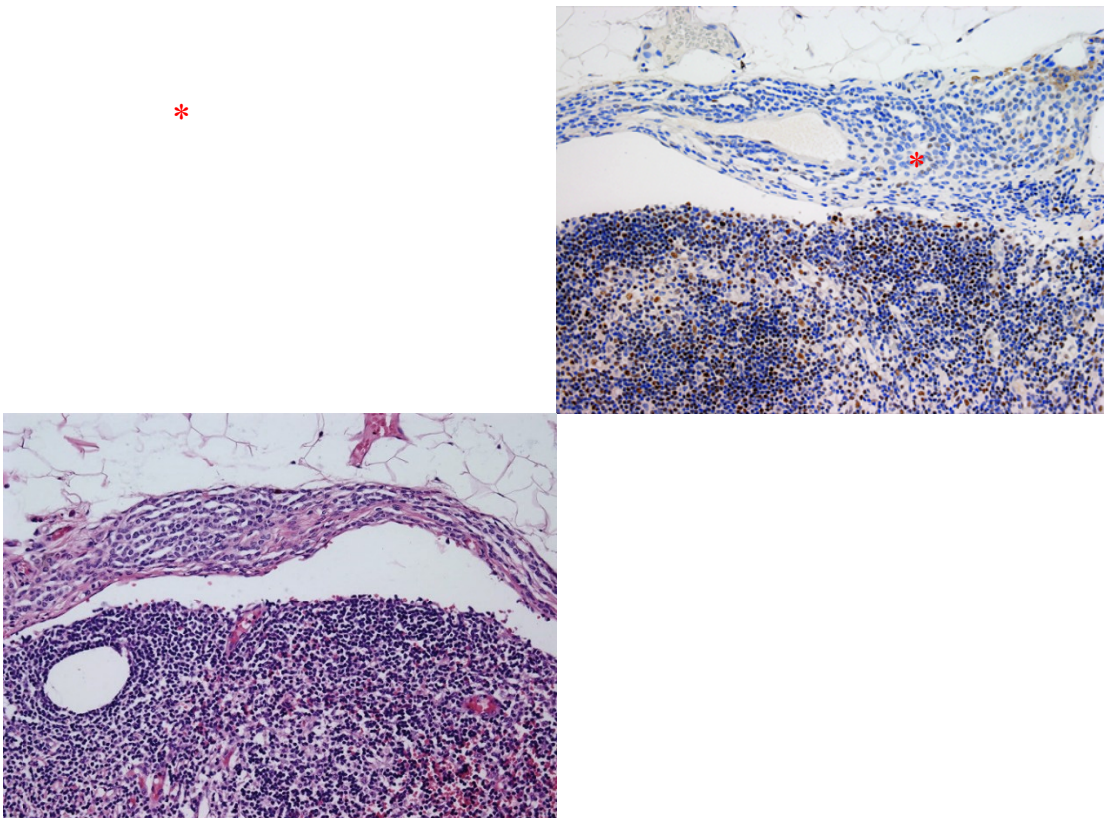


Figura 4.15. Expresión p62 en nevus ganglionar. Nevus ganglionar (señalado con *)
En las columnas de la izda tinción HE(x20) muestra el foco de células névicas -
intracapsular. Columnas de la derecha IHQ con p62(x20), no se observa expresión
en nevus.

DEK. En los nevus ganglionares se observó bajos niveles de expresión de DEK (Figura 4.16.) (1 caso positivo de 33 casos, 3%). El patrón de expresión fue nuclear.



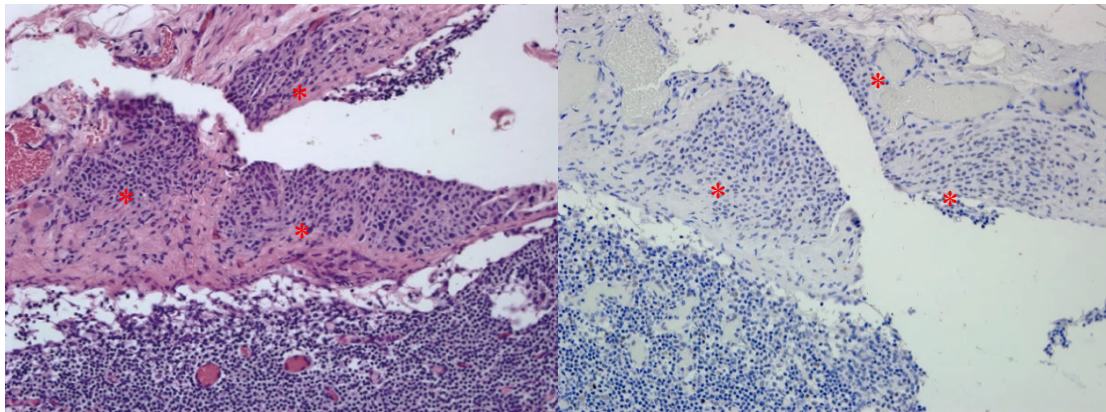


Figura 4.16. Expresión de DEK en nevus ganglionar. Nevus ganglionar (señalado con *) En las columnas de la izda tinción HE(x20) muestra el foco de células névicas intracapsular. Columnas de la derecha IHQ con DEK(x20), no se observa expresión en nevus.

Cabe destacar que en los casos de nevus con HMB45 positivo (nº10, nº17, nº26), otros 3 de los marcadores estudiados ayudaron al diagnóstico diferencial de nevus y melanoma (Tabla 4.6.); p16 mantuvo su expresión de forma constante y DEK fue negativo; en ningún caso se observó expresión fuerte de p62 aunque un caso mostró positividad débil. El caso nº26 se trataba de células sueltas intraparenquimatosas, y p62 y DEK no fueron valorables (NV). En la figura 4.17. Se muestra el caso nº17.

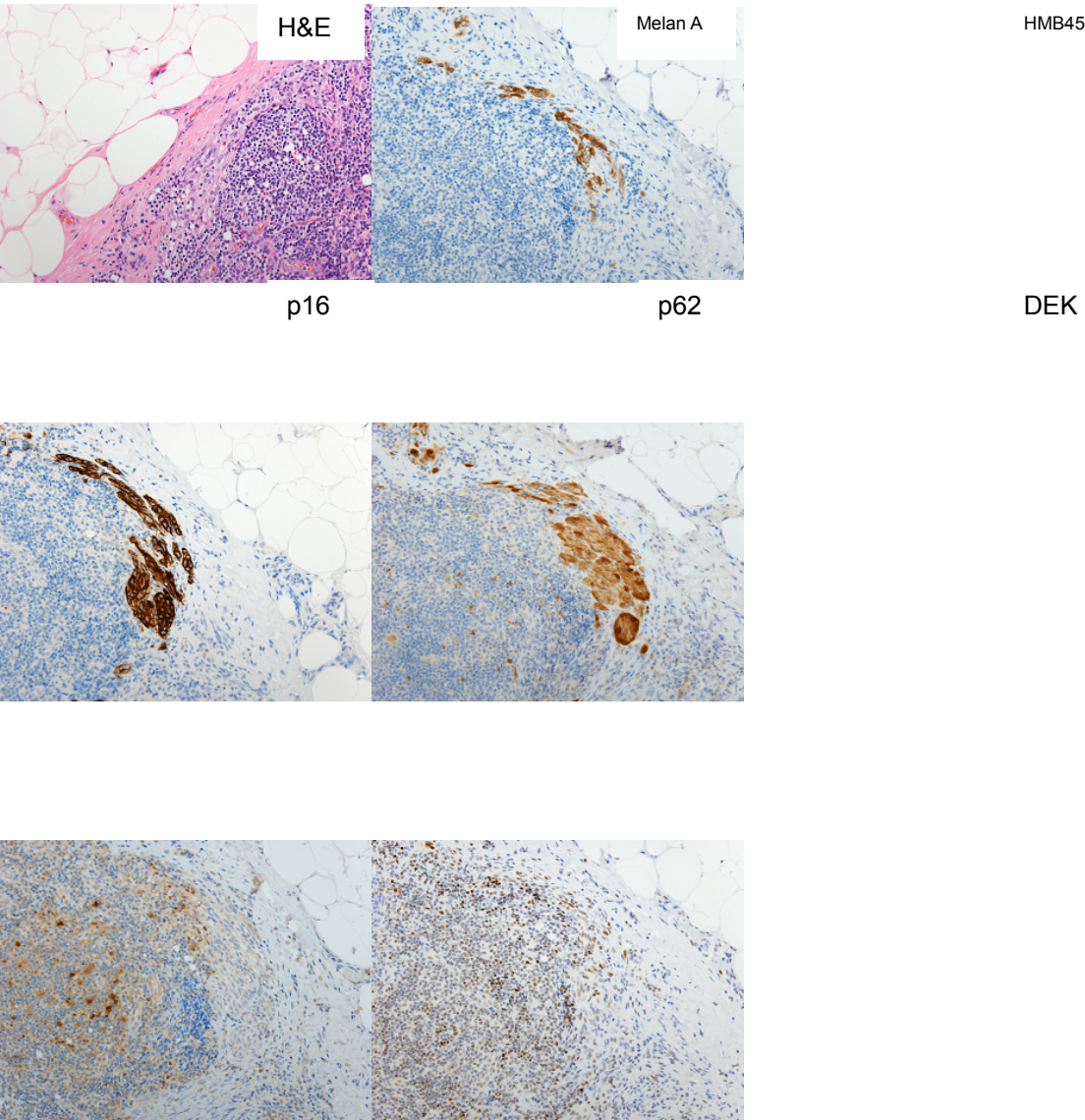


Figura 4.17. Nevus ganglionar con características IHQ atípicas en cuanto a HMB45, se observa positividad intensa y difusa. El resto de los marcadores estudiados apoyan el diagnóstico de nevus: mantiene expresión de p16 y p62 y DEK son negativos.

4.2.2.2. Características inmunohistoquímicas de las metástasis ganglionares de melanoma

Las características inmunohistoquímicas de las metástasis ganglionares de melanoma se muestran a continuación en la tabla 4.7. y detalladas por caso en la tabla 4.8. En la figura 4.18. se muestra un caso de metástasis ganglionar de melanoma con las características IHQ más habituales.

Tabla 4.7. Características inmunohistoquímicas de las metástasis ganglionares de melanoma.

MARCADORES PROTEICOS	CASOS POSITIVOS/TOTAL	% CASOS POSITIVOS
Melan A	38/40	95%
HMB-45	32/40	80%
p16	4/40	10%
p62	35/40	87,5%
DEK	33/39	84,6%

Los datos reflejan el número de casos positivos sobre el total de casos analizables

Tabla 4.8. Características inmunohistoquímicas detalladas de las metástasis ganglionares de melanoma.

Ganglios	Melan A	HMB45	p16	p62	DEK
1	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
2	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
3	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
4	positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
5	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
6	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
7	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
8	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
9	positivo	positivo	negativo	negativo	Positivo
10	positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
11	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
12	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
13	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
14	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
15	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
16	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
17	positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
18	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
19	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
20	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
21	positivo	positivo	negativo	negativo	Positivo
22	positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
23	positivo	positivo	negativo	negativo	Positivo
24	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
25	positivo	positivo	positivo	negativo	Positivo
26	positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
27	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
28	negativo	positivo	negativo	positivo	Positivo
29	positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
30	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
31	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
31	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
33	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
34	negativo	negativo	negativo	positivo	Positivo
35	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
36	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
37	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
38	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
39	positivo	negativo	negativo	negativo	NV
40	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo

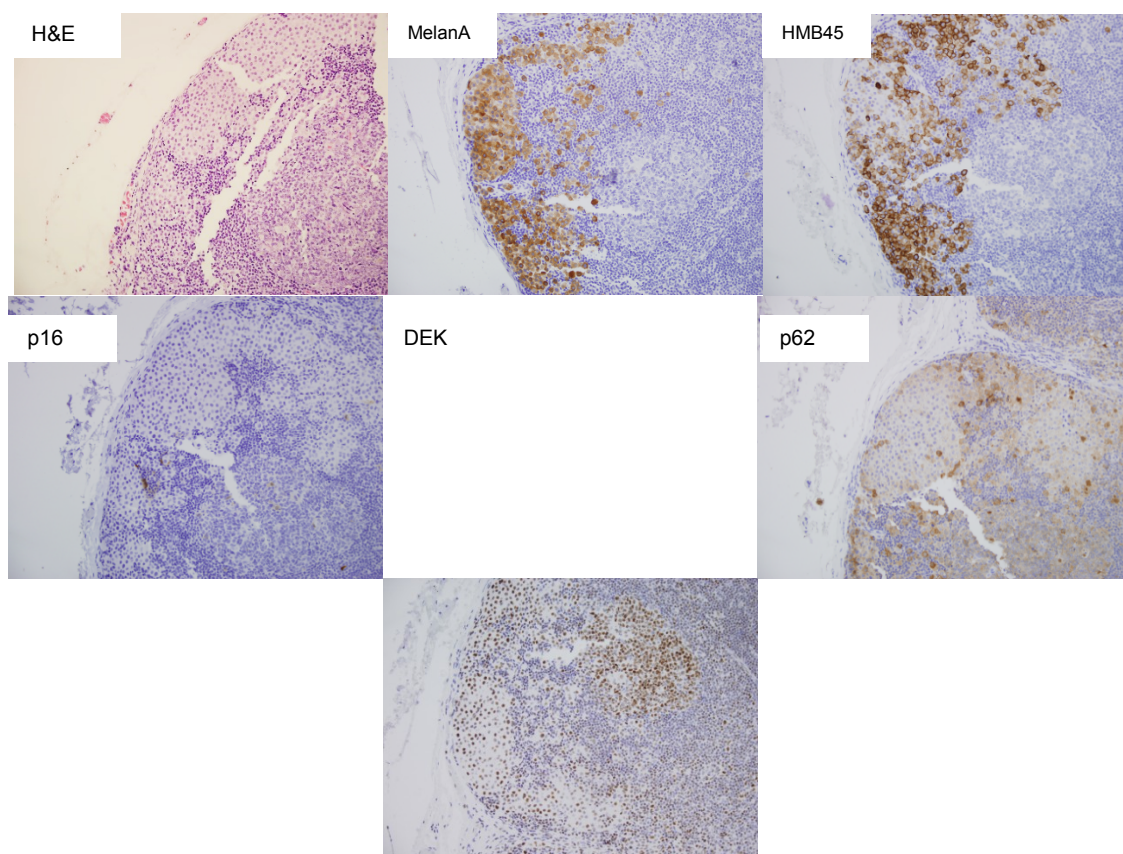


Figura 4.18. Metástasis ganglionar de melanoma con las características IHQ más habituales (x20). HE muestra agrupación de células intracapsulares del ganglio. Dichas células expresan intensamente Melan A y HMB45 y no muestran expresión de p16. Se observa expresión nuclear de DEK en la mayoría de las células y expresión citoplásmica de p62 en las mismas.

En cuanto a los marcadores de diferenciación melanocítica, las metástasis ganglionares de melanoma mostraron una positividad muy alta (95%, 38 casos positivos de 40) para Melan A y una positividad alta para HMB-45 (80% ,32 casos positivos de 40). Ambos tuvieron un patrón de expresión citoplásmico, en la mayoría de los casos intenso y difuso.

Se observó pérdida de la expresión de p16 en las metástasis ganglionares de melanoma, especialmente pérdida de la expresión nuclear del marcador. Mostraron positividad para p16, 4 de 40 casos (10%) y en estos se observó positividad citoplásmica entorno al 100% y sin embargo en los núcleos en rango de 0 a 40% (Figura 4.19.)

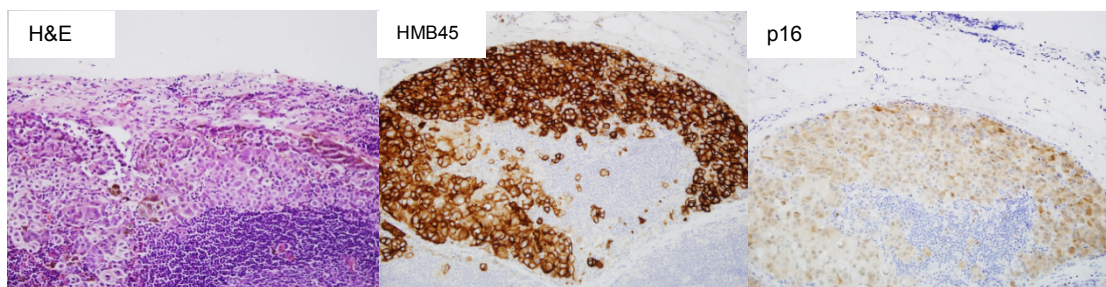


Figura 4.19. Expresión p16 en metástasis ganglionar de melanoma (x20). Con HE se aprecia el infiltrado por células grandes con atipia citológica. HMB45 positivas. Muestran expresión de p16 pero con pérdida de la expresión nuclear del mismo

En cuanto a p62, se observó una positividad importante en las metástasis ganglionares de melanoma (35 casos positivos de 40, 87,5%). El patrón de expresión fue citoplásmico y nuclear (Figura 4.20)

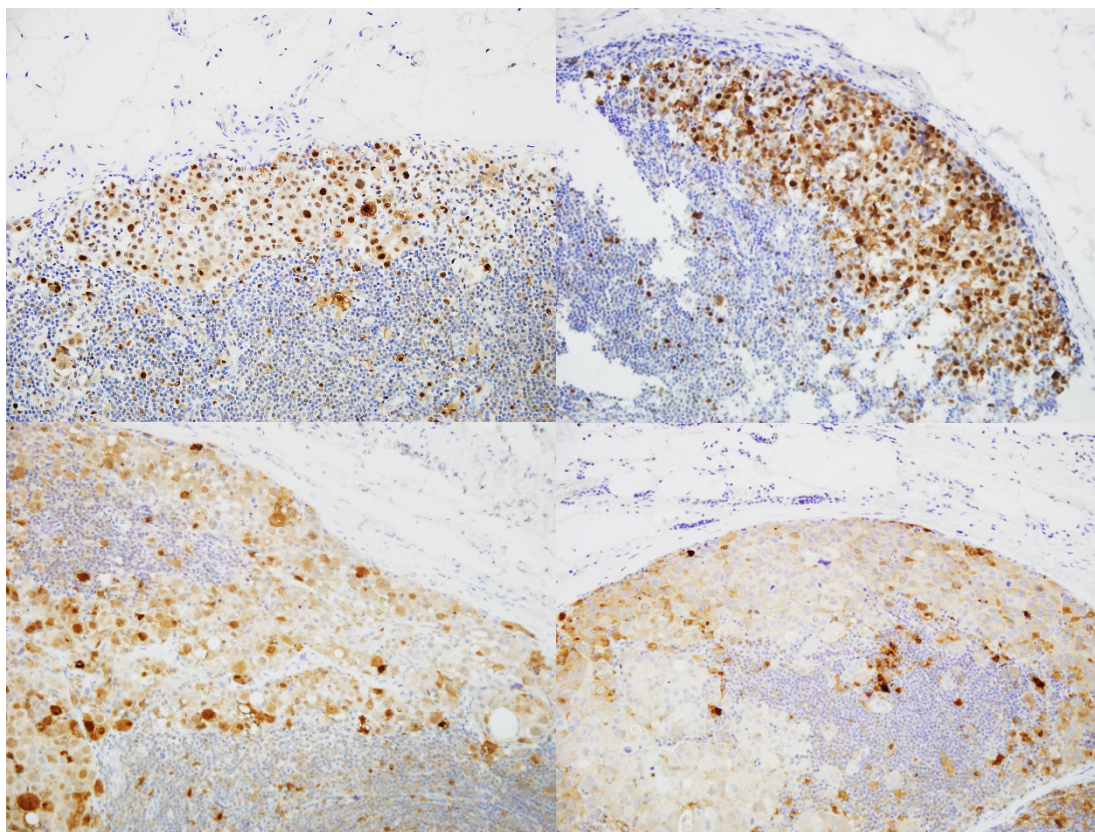


Figura 4.20. Expresión de p62 en metástasis ganglionares de melanoma. Se observa importante expresión citoplásmica y nuclear en las células de melanoma.

Se observó expresión de DEK en 33 de 39 casos (84,7%) y el patrón de expresión fue nuclear y de intensidad alta (Figura 4.21.)

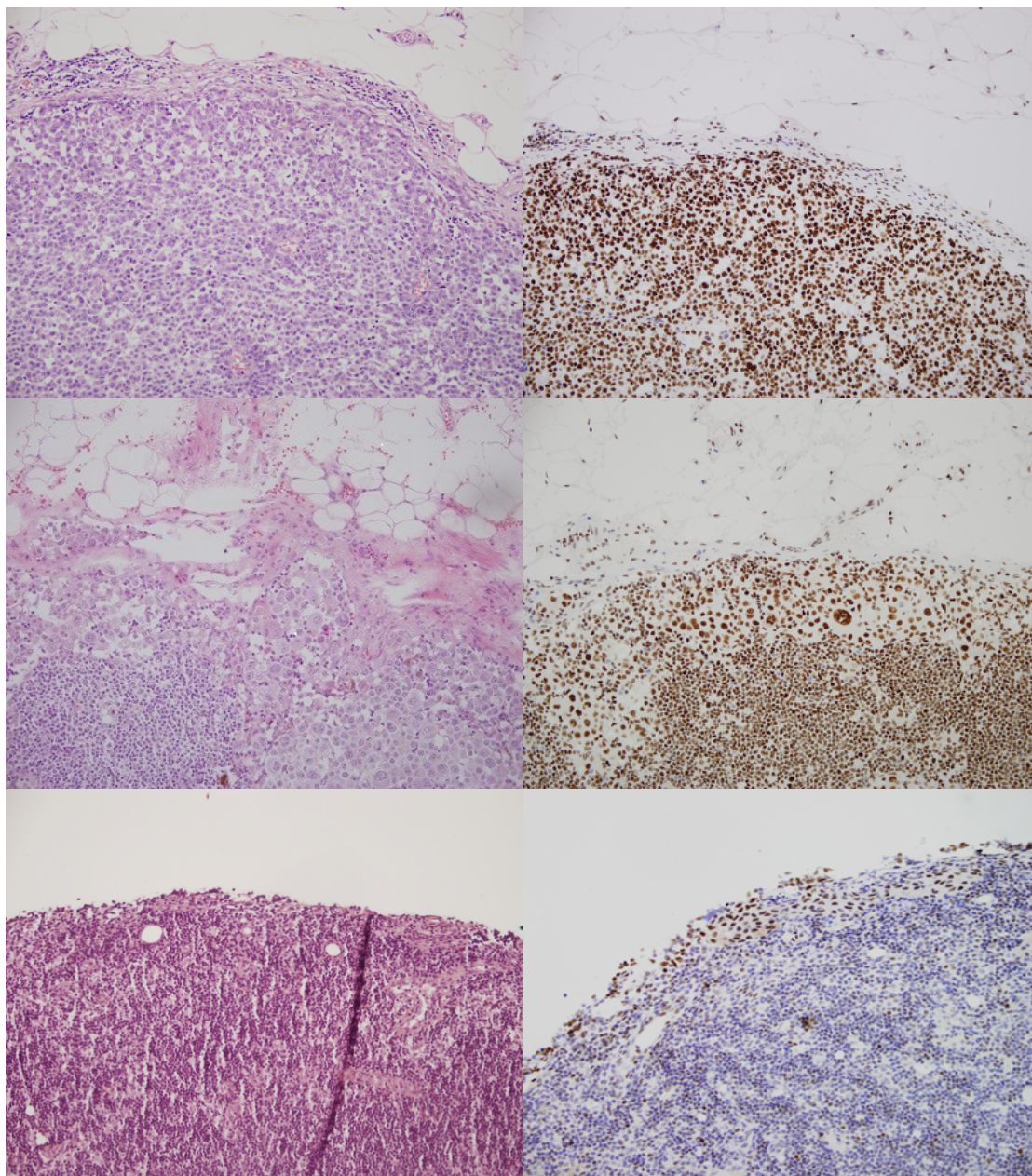


Figura 4.21. Expresión de DEK en metástasis ganglionares de melanoma. Muestra metástasis ganglionares de melanoma, en la columna de la izda HE (x20) donde se observa el infiltrado por células grandes con atipia, en la columna de la derecha IHQ con DEK, donde se observa que dichas células muestran expresión nuclear intensa; así mismo se observa expresión en linfocitos ganglionares.

Destacó, además del valor cuantitativo y cualitativo de la expresión de DEK y p62, su utilidad en el diagnóstico diferencial de lesiones de difícil diagnóstico. En la tabla 4.8. hemos mostrado los resultados de todos los casos, podemos ver como en los casos de metástasis ganglionares de melanoma nº 4, 10, 17, 22, 26, 29, 34 y 39 la expresión de HMB-45 es negativa. En la mayoría de estos (casi el 90%) se observa

expresión de p62 y DEK, ayudando al diagnóstico de melanoma; a su vez se observa como la pérdida de expresión de p16 se mantiene también como un marcador constante en estos casos (100%) (Figura 4.22.).

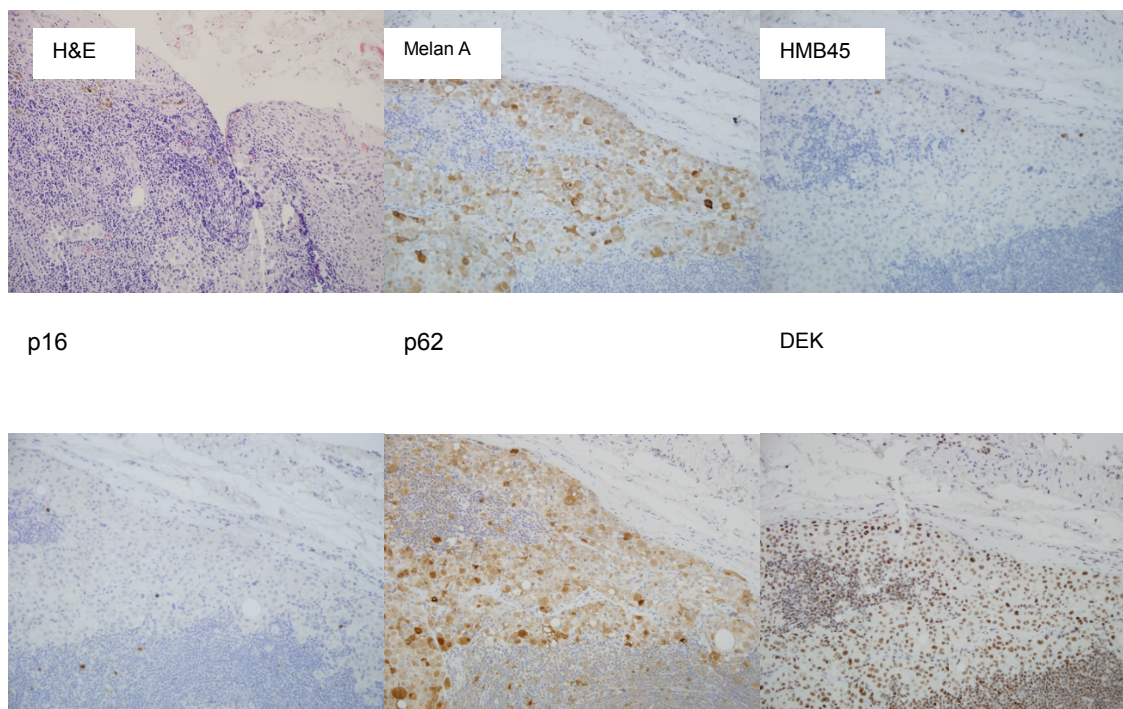


Figura 4.22. Metástasis ganglionar de melanoma HMB45 negativa (Caso n°10) (x20). Se observa expresión de Melan A, p62 y DEK y pérdida de la expresión de p16.

4.2.2.3. Comparación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en nevus ganglionares frente a las metástasis ganglionares de melanoma

La tabla 4.9. muestra los resultados de la expresión de los marcadores estudiados en metástasis ganglionares de melanoma y los compara con los resultados previamente obtenidos en los nevus ganglionares. En la figura 4.23. se muestra la expresión de los distintos marcadores comparando un nevus ganglionar con una metástasis ganglionar de melanoma.

Tabla 4.9. Características inmunohistoquímicas de metástasis ganglionares de melanoma y comparación con los nevus ganglionares.

	NEVUS GANGLIONAR		METÁSTASIS DE MM		VALOR p
	CASOS/TOTAL	%	CASOS/TOTAL	%	
Melan A	38/38	100%	38/40	95%	0,163
HMB-45	3/36	8,3%	32/40	80%	0,0001
p16	36/38	94,7%	4/40	10%	0,0001
p62	4/38	10,5%	35/40	87,5%	0,0001

DEK	1/33	3%	33/39	84,6%	0,0001
-----	------	----	-------	-------	--------

Los datos reflejan el número de casos positivos respecto al total (casos/total), el porcentaje correspondiente (%) y el valor de la significancia (valor p). Los resultados que han sido estadísticamente significativos están marcados en azul. MM, melanoma.

Se observó muy alta positividad para Melan A tanto en nevus ganglionares como en las metástasis de melanoma, en el 100% y 95% de los casos respectivamente (p valor =0,163)

HMB-45 mostró una alta reactividad en las metástasis ganglionares de melanoma (80%), frente a la escasa expresión en nevus ganglionares (8,3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0,0001). La Sensibilidad de HMB45 para discriminar nevus ganglionar de metástasis ganglionar de melanoma fue del 81,58% y la Especificidad del 89,47%.

En relación con p16, se observaron diferencias significativas: los nevus ganglionares mostraron muy alta positividad (94,7%) y esta expresión fue nuclear y citoplásmica; en contraste, en las metástasis ganglionares de melanoma se observó pérdida de la expresión de p16 (10% de casos positivos), observándose principalmente pérdida de la expresión nuclear, siendo estas diferencias también estadísticamente significativas (p=0,0001). La Sensibilidad de p16 para discriminar nevus ganglionar de melanoma fue del 89,47% y la Especificidad del 82,50%.

La expresión de p62 mostró diferencias significativas entre nevus ganglionares (baja expresión: 10,5%) y metástasis ganglionares de melanoma (alta expresión: 87,5%) (p=0,0001). La Sensibilidad de p62 para discriminar nevus ganglionar de melanoma fue del 89,47% y la Especificidad del 87,50%.

En relación con DEK, se observó un importante incremento de su expresión en metástasis ganglionares de melanoma (84,6%), frente a nevus ganglionares (3%, 1 solo caso), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0,0001). De forma que si una lesión mostraba intensa expresión de DEK era muy sugestivo de melanoma. La Sensibilidad de DEK para discriminar nevus ganglionar de melanoma fue del 86,84% y la Especificidad del 97,06%.

En resumen, podemos decir que se observaron importantes diferencias en la expresión de marcadores proteicos entre metástasis de melanomas y nevus ganglionares.

De esta forma, se observó en las metástasis de melanoma incremento de expresión de p62 y DEK, proteínas facilitadoras de la tumorigénesis y pérdida de la expresión de p16, que actúa en sentido inverso, como supresor tumoral. Como se ha comentado previamente, destacó la expresión de DEK y p62 y la pérdida de la expresión de p16 en los 8 casos de metástasis ganglionares de melanoma sin expresión de HMB-45. Y de forma similar en nevus, destacó la expresión de p16 y ausencia de expresión de DEK y p62 en nevus que expresaron HMB45.

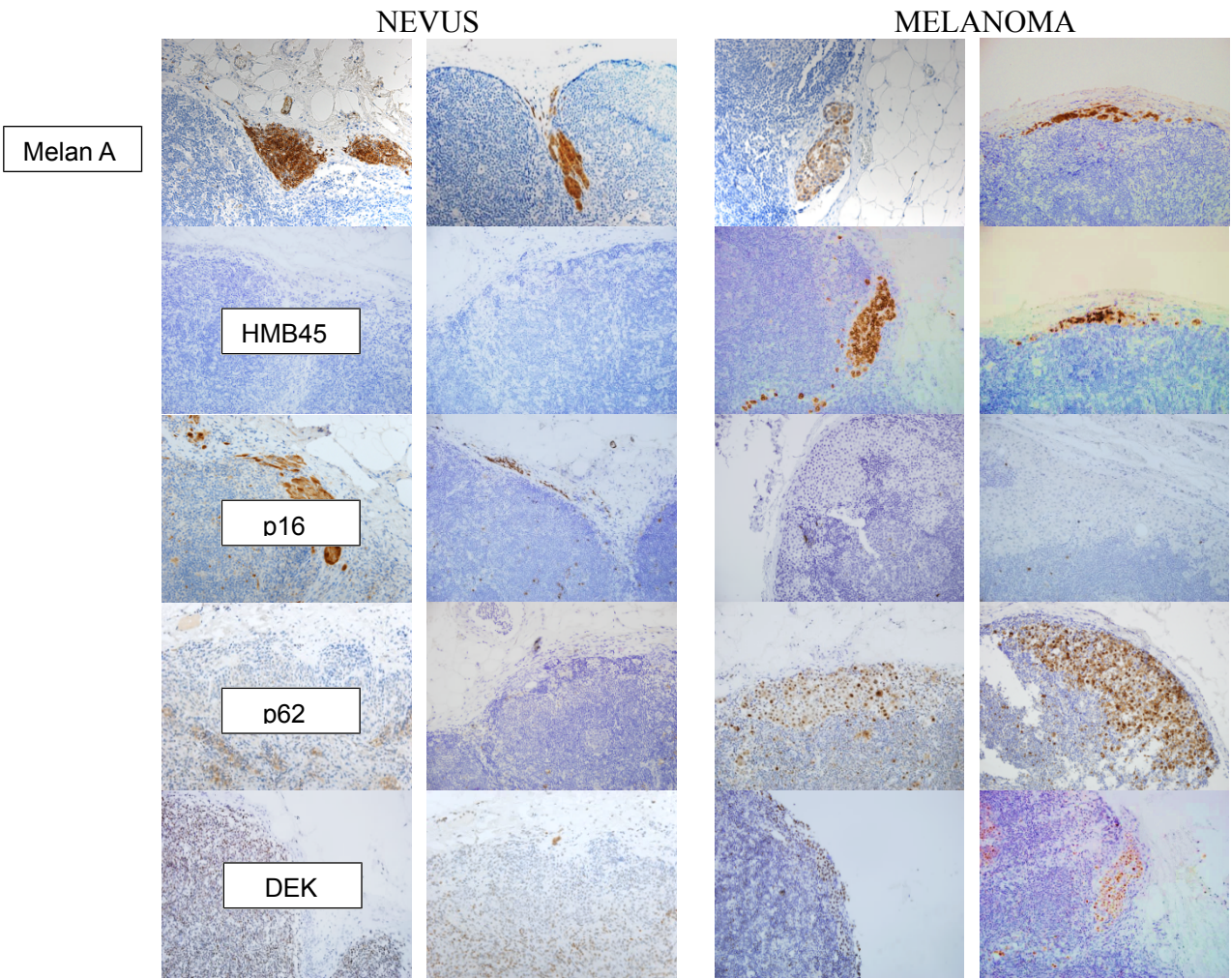


Figura 4.23. Comparación de la expresión de marcadores estudiados en nevus ganglionar (columnas de la izquierda) frente a metástasis ganglionar de melanoma (columnas de la derecha)(x20). Se observa como ambas lesiones expresan Melan A de forma intensa y difusa. Los nevus son HMB45 negativos mientras que los melanomas expresan intensamente dicho marcador. Se observa pérdida de la expresión de p16 en melanoma. No se observa expresión de p62 y de DEK en nevus mientras que los melanomas sí muestran expresión de ambos.

4.2.2.4. Comparación de la expresión de reticulina

Finalmente, se realizó el estudio para valorar la expresión de reticulina en las lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos y su contribución al diagnóstico diferencial entre lesiones benignas, nevus, de malignas, metástasis de melanoma. Se trató de un trabajo con un número menor de especímenes, limitado por el agotamiento de la muestra en el caso de los nevus ganglionares. Se incluyeron en el estudio 15 casos de nevus ganglionares y 24 casos de metástasis ganglionar de melanoma. Fueron valorables para su análisis 10 casos de nevus y 22 de melanoma, siendo 5 casos de nevus y 2 de melanoma no valorables.

Los resultados se muestran en la tabla 4.10. Fueron los siguientes: En 9/10 nevus (90%) las fibras de reticulina se dispusieron rodeando células individuales (Figura 4.24.). En el único caso diferente, se observó un patrón mixto, las fibras de reticulina se dispusieron rodeando tanto células individuales como grupos de células. En 22/22 melanomas (100%) las fibras de reticulina se dispusieron rodeando grupos de células, no se observó ningún caso en el que las fibras envolvieran células de forma individual (Figura 4.25.). En la figura 4.26. se compara la tinción con reticulina en células melanocíticas benignas y malignas en ganglios linfáticos.

Se trata de una tinción más compleja de interpretar en comparación con otras (Melan-A, HMB45, etc) porque las células no expresan reticulina y lo que se visualiza es su contorno, no siendo además una tinción con alta intensidad o contraste.

Tabla 4.10. Características de la tinción con reticulina en nevus ganglionares y metástasis ganglionares de melanoma.

RETICULINA	NEVUS	MELANOM A
Envolviendo células	9/10	0 (0%)

individuales	(90%)	
Envolviendo grupos de células	0 (0%)	22/22 (100%)
Patrón mixto	1/10 (10%)	0 (0%)

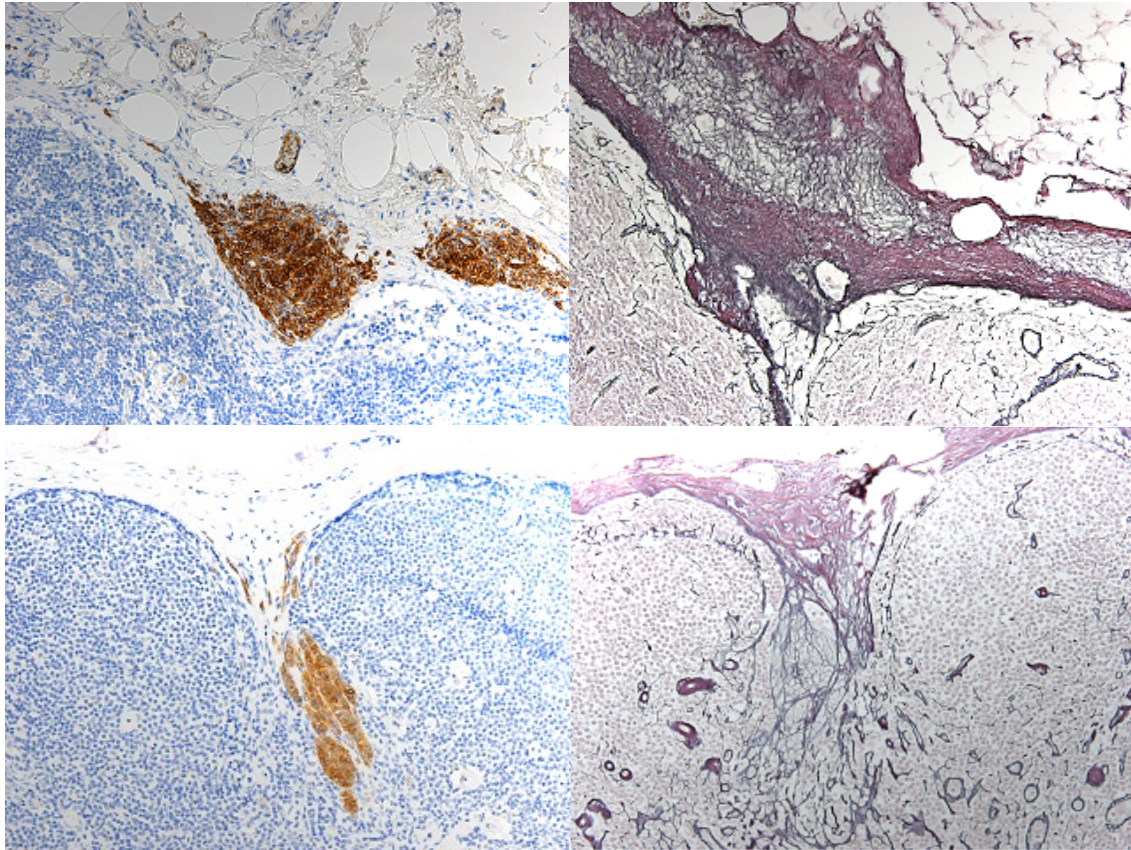
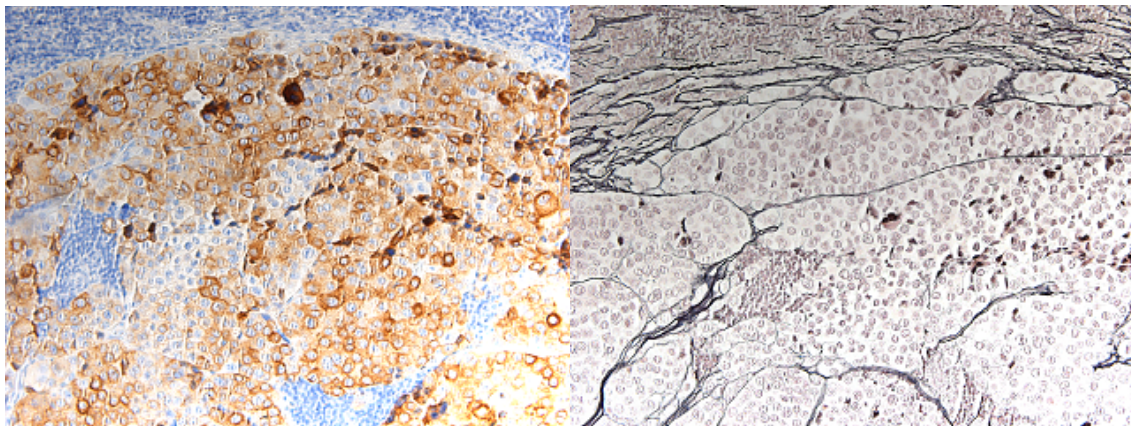


Figura 4.24. Tinción con reticulina en nevus ganglionar. Las columnas de la izquierda muestran expresión de Melan A para facilitar la localización de la lesión melanocítica (x20). En las columnas de la derecha se muestra la tinción con reticulina de las mismas (x20). Se observa como las fibras de reticulina se distribuyen rodeando células individuales.



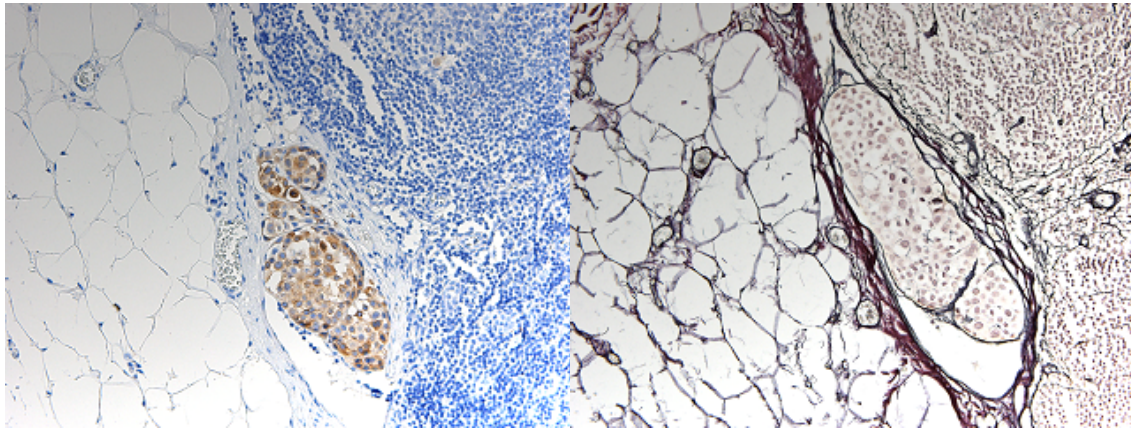


Figura 4.25. Tinción con reticulina en metástasis ganglionar de melanoma. Las columnas de la izquierda muestran expresión de Melan A para facilitar la localización de la lesión melanocítica (x20). En las columnas de la derecha se muestra la tinción con reticulina de las mismas (x20). Se observa como las fibras de reticulina se distribuyen rodeando grupos de células.

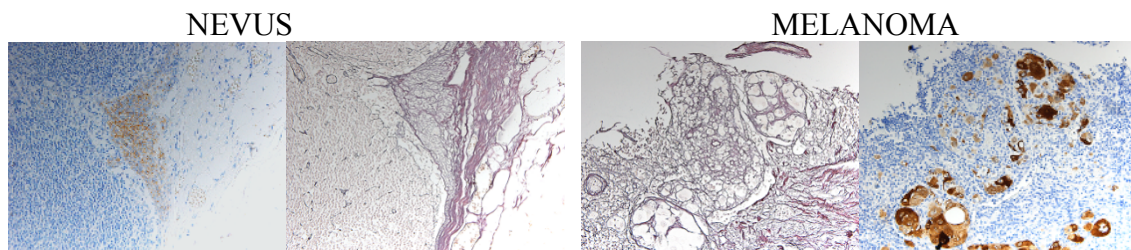


Figura 4.26. Comparación de la tinción con reticulina en nevus ganglionares (izquierda) frente a metástasis de melanoma (derecha). Se observa como en nevus las fibras de reticulina se disponen envolviendo células individuales y en melanom envolviendo grupos de células.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSION

5.1. La ecografía como método de estadificación ganglionar

5.1.1. ¿Puede sustituir a la BSGC?

Los resultados observados en nuestro estudio concuerdan con los encontrados en la literatura y permiten considerar a la ecografía como un método válido de estadificación previa a la BSGC, aunque en ningún caso sirve para sustituirla. En nuestro trabajo obtuvimos cifras intermedias de sensibilidad y especificidad respecto a estudios previos (tabla 5.1.)(40,44,45,47–50,53,57,59,222).

Tabla 5.1. Resumen de los principales estudios en ecografía ganglionar previa a la BSGC en pacientes con melanoma cutáneo.

Estudio	Método	N	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Bossi et al, 2001(43)	Ecografía	94	89,4	90,3	65,3	97,6
Rossi et al, 2003(50)	PAAF guiada por ecografía	125	39	100	100	85
Hocevar et al, 2004(45)	PAAF guiada por ecografía	57	71	84	59	90
Van Rijk et al, 2006(10)	PAAF guiada por ecografía	107	4,7	100	3,8	70
Voit et al, 2009(58)	PAAF guiada por ecografía	400	65	99	93	92
Sanki et al, 2009(49)	Ecografía	716	24,3	96,8	59,6	88,3
Hinz et al, 2013(44)	Ecografía vs PET/TC	20	11,8 0	100 100	100 0	73,7 71,1
Rubaltelli et al, 2014(48)	Ecografía vs Eco con contraste	540	71 98	100 99	ND ND	ND ND
Ulrich et al, 2015(59)	PAAF guiada por ecografía	800	56	99	92	89
Nuestro estudio	Ecografía y BAG guiada por ecografía	384	46 44,5	76 60,9	41 100	79 74,6

N= Número total de pacientes evaluados en el estudio; S= Sensibilidad; E= Especificidad; VPP= Valor predictivo positivo; VPB= Valor predictivo negativo. ND= No disponible.

Es importante destacar que un 34% de los pacientes con ecografía indeterminada y, por lo tanto, con características ecográficas no definitivas de metástasis pero con rasgos que no permiten descartarlas, tenían metástasis ganglionar. Por otra parte, en los pacientes con ecografía patológica, la biopsia ecodirigida permitió detectar metástasis en más de la mitad de ellos. Dado que presentó también un porcentaje de falsos negativos, ante un resultado negativo se debería completar la estadificación mediante la BSGC.

5.1.2. Biopsia ecodirigida

Las cifras de sensibilidad y especificidad de la biopsia ecodirigida obtenidas en nuestro trabajo son 44,5% y 60,9% respectivamente de forma global. Por lo tanto, consideramos que ante un resultado negativo se debería completar la estadificación mediante la BSGC.

En los pacientes con ecografía indeterminada, las cifras obtenidas de sensibilidad y especificidad de la biopsia ecodirigida fueron: sensibilidad 42% y especificidad 84,4%. De todos los pacientes con ecografía indeterminada, un 34% tenían finalmente metástasis y un 42% de estos fueron detectados por la biopsia ecodirigida; por ello, es fundamental la realización de biopsia ecodirigida en pacientes con ecografía indeterminada.

La principal ventaja de la ecografía con biopsia ecodirigida previa a la BSGC es que hace innecesaria la realización de la BSGC en aquellos casos en los que se detecta metástasis mediante la biopsia ecodirigida. De los 102 pacientes que presentaron metástasis ganglionar, 23 casos (22,5%) fueron detectados mediante la biopsia ecodirigida. Del total de pacientes (384) se evitó realizar la BSGC en 23 (6%). Pese a no ser un gran número, para los pacientes que pueden beneficiarse de esta situación supone una ventaja importante, ya que, aunque la BSGC es un proceso poco invasivo, no está exento de complicaciones.

Las limitaciones de nuestro estudio fueron la realización en un único Centro y, al tratarse de un estudio retrospectivo, la ausencia de aleatorización y grupo control. En cuanto a la biopsia ecodirigida obtuvimos cifras intermedias de sensibilidad y especificidad respecto a otros estudios, lo que requiere el análisis de posibles causas y establecer un plan de mejora en las causas corregibles.

Se detectó un mayor porcentaje de falsos negativos en pacientes con menor espesor de Breslow ($<2\text{mm}$) respecto a los de mayor espesor ($>2\text{mm}$). Se ha observado en la literatura que melanomas con menor espesor de Breslow se asocian a menor carga metastásica y mayor dificultad para obtener una muestra adecuada con la biopsia ecodirigida (49,50). También se ha detectó una menor sensibilidad en pacientes de mayor edad, dato no observado en estudios previos; es posible que esto también pueda estar relacionado con la carga tumoral o con los cambios anatómicos y fisiológicos ocurridos con la edad. Serían precisos análisis por subgrupos para valorar esta hipótesis.

5.2. Estudio inmunohistoquímico de lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos

5.2.1. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes

El hallazgo de inclusiones melanocíticas benignas o restos névicos en ganglios linfáticos (nevus ganglionares) se ha descrito periódicamente en los últimos años tras la primera descripción en 1931 por Stewart y Copeland (60). La prevalencia varía según los estudios publicados entre 1% y 22% (67,70,223,224) de los pacientes a los que se realiza una extirpación ganglionar en el contexto de una neoplasia, siendo estas cifras mayores en pacientes con melanoma respecto a otras neoplasias. Precisamente, en los pacientes con melanoma este hallazgo benigno cobra más relevancia, por su posible confusión con metástasis de melanoma, lo que es de gran importancia de cara al pronóstico y tratamiento del paciente. Lo habitual es poder diferenciarlos de acuerdo a sus características citomorfológicas, pero en muchos casos el diagnóstico diferencial puede ser difícil, aún empleando los anticuerpos inmunohistoquímicos habituales.

La prevalencia encontrada en nuestro trabajo (3,5 % en pacientes con melanoma y 0% en pacientes con cáncer de mama) concuerda con la publicada en la literatura en cuanto a nevus en ganglios centinela de pacientes con melanoma (67,70,223); sin embargo, en ganglios centinela realizados por otras neoplasias (cáncer de mama), la incidencia obtenida en nuestro estudio es inferior a la publicada (63). Esto probablemente se deba a varios factores: los nevus ganglionares suelen ser de pequeño tamaño; cuando se evalúa inmunohistoquímicamente un ganglio centinela de cáncer de mama se suelen realizar tinciones para citoqueratinas, no específicas para lesiones melanocíticas, que no ponen de manifiesto el nevus; además, dado que se trata de un hallazgo benigno, puede que aunque sea visualizado por el Patólogo no se refleje en el informe. Por ello, pensamos que es posible que existieran más casos pero se hayan pasado por alto o no se hayan registrado.

En cuanto a las características clínicas y demográficas de los pacientes, se observó un mayor porcentaje de nevus ganglionares en mujeres (62,5%) y un mayor porcentaje de metástasis de melanoma en los varones (61,1%); es un dato que no siempre aparece reflejado en la literatura; en la serie de Piana et al encuentran sin embargo un mayor porcentaje de nevus ganglionares en varones (67). El subtipo de melanoma más frecuente que motivó la realización del ganglio centinela fue en ambos casos melanoma de extensión superficial, seguido del melanoma nodular y del melanoma lentiginoso acral. La localización más frecuente de las lesiones melanocíticas fue el tronco (48,6%), con proporción similar entre la lesiones benignas (50%) y los melanomas (48,6%). La media del espesor de Breslow de todos los melanomas seleccionados fue de 5,37 mm y fue similar en ambos grupos. En nuestro trabajo la mayoría de los melanomas primarios presentaron un nivel III o IV de Clark y el porcentaje fue similar en ambos grupos. Un 5,5% de los pacientes presentaron nevus y metástasis ganglionares de forma concomitante, dato inferior a lo publicado en la literatura. En la serie de Piana et al (67) encuentran coexistencia de nevus ganglionar y metástasis de la neoplasia que motivó la extirpación ganglionar en 10 de 60 casos (16,6%), (5 pacientes con melanoma y 5 con cáncer de mama). En la serie de Bautista et al (63) realizada en pacientes con cáncer de mama, encuentran 22 casos de nevus ganglionares, y de ellos 1 en el que coexisten nevus ganglionar y metástasis. Holt et al (61) encuentran 1 caso en el que coexisten nevus ganglionar y metástasis de melanoma en su serie de 8 nevus ganglionares (12,5%). La mayoría de los nevus ganglionares de nuestro estudio se localizaron en el estroma fibroso del ganglio (cápsula o septos) y en

la zona subcapsular. Se obtuvieron 5 casos de localización poco habitual: 4 casos de localización intraparenquimatosa o subcapsular con extensión intraparenquimatosa y uno de localización intravascular además de intracapsular.-En las series de Ridolfi (223) con 3 casos , Carson (224) con 49 , Fontaine (62) con 6 casos y Holt (61) con 8 casos, todos los nevus se encontraron en el estroma fibroso del ganglio. Se han publicado casos aislados con localización intraparenquimatosa o perivascular (67,69), como en la serie de Piana (67), con una muestra de 60 nevus y 3 casos con extensión intraparenquimatosa. En nuestro estudio, la localización de las metástasis ganglionares de melanoma fue principalmente subcapsular e intraparenquimatosa, aunque en 5% de los casos fue capsular. En ambos grupos, la mayoría de los ganglios eran ganglios centinela.

5.2.2. Análisis inmunohistoquímico de las lesiones melanocíticas

En el estudio histopatológico de los ganglios linfáticos de pacientes con melanoma, clásicamente se emplean principalmente dos marcadores: Melan A y HMB45 (136,160,225).

Melan A, es un componente de la membrana del premelanosoma, producto del gen *MART-1*. Es un antígeno de diferenciación melanocítica, reconocido por linfocitos T citotóxicos, que se expresa tanto en melanocitos normales como en las células proliferante de los nevus melanocíticos y melanomas (100–103,171). Melan A está principalmente presente en melanosomas y en el retículo endoplásmico y juega un papel importante en la expresión, estabilidad y procesamiento de la proteína premelanosoma 17 (PMEL17), que es necesaria para la formación del estadio II de los melanosomas (104)

HMB45. Es un anticuerpo monoclonal que reacciona frente a PMEL17, también conocida como gp100, SILV, ME20 y D12S53E, una glicoproteína citoplasmática de 10 kDa que forma parte del complejo gp100-premelanosoma, producto del gen SILV localizado en el cromosoma 12q13-q14 (124). HMB45 es fundamental para la organización estructural de los melanosomas (124).

p16 es la proteína codificada por el gen supresor de tumores CDKN2A, también conocido como MST1 (multiple supresor tumors 1) y p16INK4A, que actúa como inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina, frenando el ciclo celular (157,158).

p62 es una proteína de 62kDa con capacidad para unirse a p56 (204); estudios previos han demostrado que favorece la progresión tumoral por interacción con los sistemas de degradación y eliminación de proteínas defectuosas, mediante interacción con el sistema de ubiquitin-proteosomas y por su papel en los procesos catabólicos de autofagia (207–210) y por otro lado también contribuye a la tumorigénesis por interacción y regulación de múltiples vías de señalización celular.

DEK es una oncoproteína codificada por el oncogén *DEK*, localizado en el cromosoma 6p (178). Se ha demostrado el papel de DEK en la tumorigénesis mediante su implicación en numerosos procesos celulares (189,190) , y mediante la inhibición de la senescencia y la apoptosis celular (186,191–196). De forma específica, la sobreexpresión de DEK aumenta la resistencia a quimioterapia en el melanoma mediante la expresión -transcripcional del gen *mcl-1* e inhibición de la senescencia celular en las metástasis de melanoma (186,190)

En cuanto a la expresión de Melan A, como era de esperar, en nuestro estudio se observó positividad en el 100% de los nevus ganglionares y en la mayoría de las metástasis de melanoma, 95%; los datos son similares a los publicados en la literatura, donde se encuentra expresión de Melan A en el 100% de los nevus ganglionares (173) y entre el 57-92% de melanomas metastásicos (89,98,108,113). Realmente en todos los casos de nuestro estudio se observó expresión, lo que ocurre es que en 2 pacientes con melanoma el porcentaje de células que expresan Melan A fue bajo (40%) y teniendo en cuenta el score utilizado, se clasificaron como negativo. Su patrón de expresión fue citoplásmico, intenso y difuso. Resulta un buen marcador para identificar lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos, aunque no es específico de lesión benigna/maligna y no sirva para el diagnóstico diferencial entre ambas.

Con HMB45 obtuvimos 80% de positividad en las metástasis de melanoma y 91,7% de negatividad en nevus ganglionares, datos similares a los publicados previamente en la literatura. Según las diferentes series, se ha reportado expresión de HMB45 entre un 58 y un 95% de las metástasis de melanoma (98,109,113,138), y en una revisión de 866 casos de 13 estudios diferentes se obtiene una media de expresión del 83% (88,98,126). En cuanto a nevus ganglionares las publicaciones son más escasas; en la mayoría de las series publicadas todos los nevus fueron HMB45 negativos (69,159), sin embargo en otras series, como la publicada por Holt, se observan 3 casos, sobre un total de 8 nevus, HMB45 positivos (61); En nuestro estudio, la mayoría de los casos de metástasis ganglionar de melanoma (80%) expresaron HMB45 y la mayoría de los casos de nevus (91,7%) fueron negativos. Resulta pues, un marcador con alta sensibilidad y especificidad y en general de gran utilidad, aunque hay un porcentaje de lesiones melanocíticas (entorno a un 15% según los estudios; en nuestro trabajo en un 20% de metástasis de melanoma y en 8,3% de nevus) que no se clasifican correctamente en función a su expresión, por lo que en casos que ofrezcan dudas por otros motivos (citología o morfología algo atípica, tinciones IHQ discordantes, etc) hay que utilizarlo con cautela.

En nuestro estudio, p16 presentó altas cifras de sensibilidad y especificidad y fue de gran utilidad para discriminar lesiones melanocíticas benignas de malignas. Mostró altos niveles de expresión en nevus ganglionares (94,7% del total de nevus) y su patrón de expresión fue en la mayoría de los casos es intenso y difuso, nuclear y citoplásmico. Las metástasis de melanomas mostraron expresión de p16 en el 10% de los casos, aunque estos casos mostraron principalmente expresión citoplásmica. En la mayoría de los casos de metástasis ganglionar de melanoma se observó pérdida de la expresión nuclear de p16. Así, a mayor pérdida de expresión de p16 es más probable que la lesión se trate de un melanoma. Una pérdida total de la expresión nuclear de p16 es altamente diagnóstica de melanoma. Obtuvimos cifras similares a las publicadas en la literatura (100% expresión en nevus y 98-100% de pérdida de expresión nuclear en melanoma) (67,159,160,162)

En cuanto a la expresión de p62, en nuestro trabajo se observó un bajo porcentaje de expresión: 10,5% de los casos, en nevus ganglionares y un alto porcentaje de expresión: 87,5% en metástasis de melanoma. La literatura publicada respecto a la expresión de p62 en lesiones melanocíticas es escasa en piel y nula en nevus ganglionares. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo mostraron ausencia de expresión en nevus comunes de localización cutánea, mientras que observaron aumento progresivo de la expresión de p62 paralelo a la progresión del melanoma cutáneo, encontrando las cifras más altas de expresión en metástasis ganglionares (62,9%) y viscerales de melanoma (81,8%). No se ha estudiado previamente la expresión de p62 en casos de nevus con localización ganglionar. P62 resulta pues, un buen marcador para discriminar nevus de melanoma, de forma que si no existe expresión de p62 va muy a favor de que la lesión se trate de un nevus y en contra de melanoma, y si la lesión presenta fuerte expresión de p62 es muy probable que se trate de un melanoma y no de un nevus. Sin embargo, cuando se observa expresión débil de p62 es difícil discriminar entre nevus y melanoma. De esta forma, p62 resulta muy útil en lesiones melanocíticas ganglionares si no se expresa o si lo hace de forma intensa, pero su valor se reduce en situaciones intermedias.

DEK. En nuestro trabajo se observaron unos bajos niveles de expresión de DEK en nevus ganglionares (1 caso positivo de 33 nevus ganglionares, 3%). En metástasis ganglionares de melanoma obtuvimos expresión de DEK en 33 de 39 casos (84,7%) y el patrón de expresión es nuclear y de intensidad alta. Obtuvimos cifras más altas que las previamente publicadas en la literatura (78% de las metástasis de melanoma mostraron alta expresión en el estudio de Kappes (197), 58,6% de los casos en el estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo (181); observándose en ambos aumento progresivo de la expresión de DEK paralelo a la progresión tumoral (181,197). De forma similar, en el estudio de Kappes la mayoría de las lesiones melanocíticas benignas cutáneas no mostraron expresión de DEK y sólo 4 de 49 casos (8,2%) mostraron fuerte expresión de DEK (197). En el estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (181), la mayoría de las lesiones melanocíticas benignas cutáneas fueron negativas para DEK: 69.1% (38/55) de los nevus intradérmicos, 57.1% (12/21) de los nevus de Spitz y 76% (19/25) de los nevus displásicos. No hay datos

previos publicados sobre la expresión de DEK en nevus de localización ganglionar. DEK ha resultado ser un excelente marcador para distinguir entre nevus y melanoma ganglionar, con una sensibilidad aceptable, pero sobre todo una especificidad cercana al 97%, de forma que cuando la lesión melanocítica ganglionar expresa DEK de forma fuerte es altamente sugestiva de melanoma. Además, DEK ha resultado ser el marcador más constante. El principal inconveniente de DEK es que su interpretación es más difícil, ya que los linfocitos ganglionares también son DEK positivos, por lo que precisa previamente un marcador que diferencie linfocitos de células melanocíticas, por ejemplo, Melan-A. Por otro lado, los linfocitos expresan DEK de forma débil o moderada, no intensa, por lo que sirven de control interno para la interpretación de DEK.

De todos los marcadores analizados para la evaluación de metástasis de melanoma, Melan A continúa siendo el más sensible, con una sensibilidad del 95%. Dada la importancia que tiene el hallazgo de metástasis ganglionares, sería deseable una sensibilidad más alta, para reducir el número de falsos negativos. Por otro lado, el resto de marcadores, aunque son más específicos de melanoma (HMB-45, p62 y DEK), tienen una sensibilidad moderada (entorno 80-90%). En resumen, se observan importantes diferencias en la expresión de marcadores proteicos entre metástasis ganglionares de melanoma y nevus, y en este trabajo hemos descrito dos nuevos marcadores, p62 y DEK, que han demostrado su utilidad para el diagnóstico diferencial entre ambas.

Cabe destacar, la utilidad de p62 y DEK en el diagnóstico diferencial de lesiones de difícil diagnóstico. En la tabla 4.17 se muestran los resultados obtenidos para cada tinción inmunohistoquímica en las metástasis ganglionares de melanoma, encontrándose 8 casos de metástasis ganglionares con expresión negativa de HMB-45. En la mayoría de estos (casi el 90%) se observa expresión de p62 y DEK, ayudando al diagnóstico de melanoma; a su vez se observa que la pérdida de expresión de p16 se mantiene también como un marcador constante en estos casos (100%). De forma similar, en la tabla 4.15 se muestran los resultados IHQ de los nevus ganglionares. Se observan 3 casos de nevus que expresan HMB45; todos conservan expresión de p16 y son negativos para p62 y

DEK (excepto un caso débilmente positivo para p62), apoyando el diagnóstico de nevus.

En el estudio que hemos realizado con reticulina se observó que en 9 de 10 nevus (90%) las fibras de reticulina se dispusieron rodeando células individuales. En el único caso diferente, se observó un patrón mixto, las fibras de reticulina se dispusieron rodeando tanto células individuales como grupos de células. En 22 de 22 melanomas (100%) las fibras de reticulina se dispusieron rodeando grupos de células; no se observó ningún caso en el que las fibras envolvieran células de forma individual (Tabla 4.19). Los datos que hemos obtenido son similares a los publicados en la literatura (174). En el trabajo de Kanner realizan un estudio con reticulina en 14 nevus ganglionares, y en 12 de 14 nevus (86%) las fibras de reticulina se dispusieron rodeando células individuales, encontrando 2 casos en los que se disponían rodeando grupos de células, y 14 metástasis ganglionares de melanoma, en las cuales el 100% de las fibras de reticulina se dispusieron rodeando grupos de células (174). En nuestro trabajo se observaron claras diferencias de disposición en nevus respecto a melanoma, de forma que en los nevus las fibras de reticulina se dispusieron envolviendo células de forma individual y en los melanomas las fibras de reticulina se dispusieron alrededor de grupos de mayor o menor número de células. No obstante, dado que el número de casos es pequeño, el estudio no permitió hacer análisis estadísticos y extrapolación de resultados a la población general, precisando estudios con mayor número de muestra. Por otro lado, la interpretación de la tinción con reticulina es más dificultosa que otras técnicas clásicas (Melan-A, HMB45, etc) porque no tiñe células y es una tinción más tenue y sutil, requiriendo más experiencia en su manejo.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- La ecografía con biopsia ecodirigida como método diagnóstico de estadificación previo a la BSGC es una herramienta útil que, aunque no la sustituye, permite evitar la realización de la BSGC en un 6% de los casos. La biopsia ecodirigida debe realizarse no solo en las adenopatías con claros signos ecográficos sospechosos de metástasis sino también en las que tienen características ecográficas indeterminadas dado que en un 34% de ellas hay afectación ganglionar metastásica.

2.- DEK y p62 han demostrado su utilidad para el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas en los ganglios linfáticos, en especial en el diagnóstico de lesiones melanocíticas que no se clasifican correctamente en función de la expresión de HMB-45, esto es en metástasis ganglionares de melanoma HMB-45 negativas y nevus ganglionares HMB-45 positivos. En estos casos en los que la expresión de HMB45 no es la esperable, DEK y p62 se expresan en melanoma y no lo hacen en nevus.

3- Melan A es el mejor marcador para identificar lesiones melanocíticas en ganglios linfáticos, aunque no es específico, ya que no permite diferenciar nevus de melanomas. HMB45 es uno de los marcadores más útiles para diferenciar nevus ganglionar de metástasis de melanoma, ya que el 91,7% de los nevus ganglionares no lo expresan mientras que el 80% de las metástasis ganglionares de melanoma si. P16 es un excelente marcador para discriminar nevus ganglionares de metástasis de melanoma, ya que la pérdida total de la expresión nuclear de p16 es altamente diagnóstico de melanoma.

4- Las fibras de reticulina se disponen envolviendo células individuales en los nevus y grupos de células en las metástasis de melanoma, lo que facilita su diagnóstico diferencial.

7. APÉNDICE

Tablas suplementarias

TNM AJCC 8ª edición(22).

Definition of primary tumor (T)

T CATEGORY	THICKNESS	ULCERATION STATUS
TX: Primary tumor thickness cannot be assessed (eg, diagnosis by curettage)	Not applicable	Not applicable
T0: No evidence of primary tumor (eg, unknown primary or completely regressed melanoma)	Not applicable	Not applicable
Tis (melanoma in situ)	Not applicable	Not applicable
T1	≤ 1.0 mm	Unknown or unspecified
T1a	<0.8 mm	Without ulceration
T1b	<0.8 mm	With ulceration
	0.8-1.0 mm	With or without ulceration
T2	>1.0-2.0 mm	Unknown or unspecified
T2a	>1.0-2.0 mm	Without ulceration
T2b	>1.0-2.0 mm	With ulceration
T3	>2.0-4.0 mm	Unknown or unspecified
T3a	>2.0-4.0 mm	Without ulceration
T3b	>2.0-4.0 mm	With ulceration
T4	>4.0 mm	Unknown or unspecified
T4a	>4.0 mm	Without ulceration
T4b	>4.0 mm	With ulceration

Definition of regional lymph node (N)

EXTENT OF REGIONAL LYMPH NODE AND/OR LYMPHATIC METASTASIS		
N CATEGORY	NO. OF TUMOR-INVOLVED REGIONAL LYMPH NODES	PRESENCE OF IN-TRANSIT, SATELLITE, AND/OR MICROSATELLITE METASTASES
NX	Regional nodes not assessed (eg, sentinel lymph node [SLN] biopsy not performed, regional nodes previously removed for another reason); Exception: pathological N category is not required for T1 melanomas, use clinical N information	No
N0	No regional metastases detected	No
N1	One tumor-involved node or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with no tumor-involved nodes	
N1a	One clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N1b	One clinically detected	No
N1c	No regional lymph node disease	Yes
N2	Two or 3 tumor-involved nodes or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with one tumor-involved node	
N2a	Two or 3 clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N2b	Two or 3, at least one of which was clinically detected	No
N2c	One clinically occult or clinically detected	Yes
N3	Four or more tumor-involved nodes or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with 2 or more tumor-involved nodes, or any number of matted nodes without or with in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases	
N3a	Four or more clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N3b	Four or more, at least one of which was clinically detected, or the presence of any number of matted nodes	No
N3c	Two or more clinically occult or clinically detected and/or presence of any number of matted nodes	Yes

Definition of distant metastasis (M)

M CRITERIA		
M CATEGORY ^b	ANATOMIC SITE	LDH LEVEL
M0	No evidence of distant metastasis	Not applicable
M1	Evidence of distant metastasis	See below
M1a	Distant metastasis to skin, soft tissue including muscle, and/or nonregional lymph node	Not recorded or unspecified
M1a(0)		Not elevated
M1a(1)		Elevated
M1b	Distant metastasis to lung with or without M1a sites of disease	Not recorded or unspecified
M1b(0)		Not elevated
M1b(1)		Elevated
M1c	Distant metastasis to non-CNS visceral sites with or without M1a or M1b sites of disease	Not recorded or unspecified
M1c(0)		Not elevated
M1c(1)		Elevated
M1d	Distant metastasis to CNS with or without M1a, M1b, or M1c sites of disease	Not recorded or unspecified
M1d(0)		Not elevated
M1d(1)		Elevated

AJCC clinical pronostic stage groups (cTNM)

WHEN T IS...	AND N IS...	AND M IS...	THEN THE CLINICAL STAGE GROUP IS...
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Any T, Tis	≥N1	M0	III
Any T	Any N	M1	IV

AJCC pathological pronostic stage groups (pTNM)

WHEN T IS...	AND N IS...	AND M IS...	THEN THE PATHOLOGICAL STAGE GROUP IS...
Tis	N0 ^b	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b or N3c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a or N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c or N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c or N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Any N \geq N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Any T, Tis	Any N	M1	IV

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *World J Surg.* abril de 1992;16(2):214-21.
2. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg Chic Ill 1960.* abril de 1992;127(4):392-9.
3. Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Th Rutgers EJ, Kroon BB. History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res BCR.* 2001;3(2):109-12.
4. Nieweg OE, Uren RF, Thompson JF. The history of sentinel lymph node biopsy. *Cancer J Sudbury Mass.* febrero de 2015;21(1):3-6.
5. Karpozilos A, Pavlidis N. The treatment of cancer in Greek antiquity. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* septiembre de 2004;40(14):2033-40.
6. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg.* noviembre de 1894;20(5):497-555.
7. Sage HH, Gozun BV. Lymphatic scintigrams: a method for studying the functional pattern of lymphatics and lymph nodes. *Cancer.* febrero de 1958;11(1):200-3.
8. Neuhaus SJ, Clark MA, Thomas JM. Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847-1930): the original champion of elective lymph node dissection in melanoma. *Ann Surg Oncol.* septiembre de 2004;11(9):875-8.
9. McLeod GR, Davis N, Sober AJ. A history of melanoma from Hunter to Clark. En: *Cutaneous Melanoma.* 3rd ed. st Louis, MO Quality Medical Publishing; 1998. p. 1-12.
10. Laennec RTH. Sur les melanosés. 1804.
11. Norris W. Case of fungoid disease. *Edinb Med Surg J.* 1820;16:562.
12. Pemberton O. Observations on the History, Pathology and Treatment of Cancerous Disease. London: John Churchill; 1858.
13. Hutchinson J. Melanosis often not black: melanotic whitlow. *BMJ.* 1886;1:491.
14. Tennent GP. On a case of multiple melanotic sarcoma. *Med J.* 1885;24:92.
15. Fergusson. Under the care of Mr Fergusson. *Lancet.* 1857;1:289.

16. Snow H. Twenty Two Years' Experience in the Treatment of Cancerous and Other Tumours. Balliere, Tindall and Cox. 1898;122.
17. Snow H. Abstract of a lecture on melanotic cancerous disease. Lancet. 1892;15:872.
18. Cochran AJ, Wen DR, Herschman HR, Gaynor RB. Detection of S-100 protein as an aid to the identification of melanocytic tumors. Int J Cancer. 15 de septiembre de 1982;30(3):295-7.
19. Reintgen DS, Jakub JW, Pendas S, Swor G, Giuliano R, Shivers S. The staging of malignant melanoma and the Florida Melanoma Trial. Ann Surg Oncol. marzo de 2004;11(3 Suppl):186S-91S.
20. Thompson JF, Uren RF, Shaw HM, McCarthy WH, Quinn MJ, O'Brien CJ, et al. Location of sentinel lymph nodes in patients with cutaneous melanoma: new insights into lymphatic anatomy. J Am Coll Surg. agosto de 1999;189(2):195-204.
21. Mangas C, Paradelo C, Rex J, Ferrándiz C. [The role of sentinel lymph node biopsy in the diagnosis and prognosis of malignant melanoma]. Actas Dermosifiliogr. junio de 2008;99(5):331-48.
22. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. noviembre de 2017;67(6):472-92.
23. Alazraki NP, Eshima D, Eshima LA, Herda SC, Murray DR, Vansant JP, et al. Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept, and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer, and other potential cancers. Semin Nucl Med. enero de 1997;27(1):55-67.
24. Doepker MP, Zager JS. Sentinel lymph node mapping in melanoma in the twenty-first century. Surg Oncol Clin N Am. abril de 2015;24(2):249-60.
25. Stebbins WG, Garibyan L, Sober AJ. Sentinel lymph node biopsy and melanoma: 2010 update Part I. J Am Acad Dermatol. mayo de 2010;62(5):723-34; quiz 735-6.
26. Stebbins WG, Garibyan L, Sober AJ. Sentinel lymph node biopsy and melanoma: 2010 update Part II. J Am Acad Dermatol. mayo de 2010;62(5):737-748;quiz 749-750.
27. Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TJ, Cochran A, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Joint Clinical Practice Guideline. J Clin Oncol. 10 de agosto de 2012;30(23):2912-8.
28. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Melanoma version 1.2017—November 10, 2016. Disponible en www.nccn.org [Internet]. [citado 7 de agosto de 2017]. Disponible en:

- https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/melanoma.pdf
29. Melanoma: assessment and management | Guidance and guidelines | NICE [Internet]. [citado 7 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng14/chapter/1-Recommendations#managing-stages-0ii-melanoma>
 30. Vidal-Sicart S, Brouwer OR, Valdés-Olmos RA. [Evaluation of the sentinel lymph node combining SPECT/CT with the planar image and its importance for the surgical act]. *Rev Esp Med Nucl.* octubre de 2011;30(5):331-7.
 31. Vidal-Sicart S, Martín MR. Detección gammagráfica e intraoperatoria del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Esp Med Nucl.* 2009;28(1):41-43.
 32. Ariyan CE, Coit DG. Clinical aspects of sentinel lymph node biopsy in melanoma. *Semin Diagn Pathol.* mayo de 2008;25(2):86-94.
 33. Roberts AA, Cochran AJ. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients: current and future trends. *J Surg Oncol.* marzo de 2004;85(3):152-61.
 34. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol.* mayo de 2005;52(5):743-75; quiz 775-8.
 35. Starz H, Haas CJ, Schulz G-M, Balda B-R. Tyrosinase RT-PCR as a supplement to histology for detecting melanoma and nevus cells in paraffin sections of sentinel lymph nodes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* septiembre de 2003;16(9):920-9.
 36. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 28 de septiembre de 2006;355(13):1307-17.
 37. McMasters KM. The Sunbelt Melanoma Trial. *Ann Surg Oncol.* octubre de 2001;8(9 Suppl):41S-43S.
 38. McMasters KM, Egger ME, Edwards MJ, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, et al. Final Results of the Sunbelt Melanoma Trial: A Multi-Institutional Prospective Randomized Phase III Study Evaluating the Role of Adjuvant High-Dose Interferon Alfa-2b and Completion Lymph Node Dissection for Patients Staged by Sentinel Lymph Node Biopsy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de abril de 2016;34(10):1079-86.
 39. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med.* 08 de 2017;376(23):2211-22.

40. Fernández Canedo I, Moreno Ramírez D, Valdés Solís P, de Troya Martín M. [Ultrasound applied to the management of malignant melanoma]. *Actas Dermosifiliogr.* noviembre de 2015;106 Suppl 1:10-20.
41. Catalano O. Critical analysis of the ultrasonographic criteria for diagnosing lymph node metastasis in patients with cutaneous melanoma: a systematic review. *J Ultrasound Med Off J Am Inst Ultrasound Med.* abril de 2011;30(4):547-60.
42. Bohelay G, Battistella M, Pagès C, de Margerie-Mellon C, Basset-Seguín N, Viguier M, et al. Ultrasound-guided core needle biopsy of superficial lymph nodes: an alternative to fine-needle aspiration cytology for the diagnosis of lymph node metastasis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* diciembre de 2015;25(6):519-27.
43. Bossi MC, Sanvito S, Lovati E, De Fiori E, Testori A, Bellomi M. [Role of high resolution color-Doppler US of the sentinel node in patients with stage I melanoma]. *Radiol Med (Torino).* diciembre de 2001;102(5-6):357-62.
44. Hinz T, Voth H, Ahmadzadehfard H, Hoeller T, Wenzel J, Bieber T, et al. Role of high-resolution ultrasound and PET/CT imaging for preoperative characterization of sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma. *Ultrasound Med Biol.* enero de 2013;39(1):30-6.
45. Hocevar M, Bracko M, Pogacnik A, Vidergar-Kralj B, Besic N, Zgajnar J, et al. The role of preoperative ultrasonography in reducing the number of sentinel lymph node procedures in melanoma. *Melanoma Res.* diciembre de 2004;14(6):533-6.
46. Kahle B, Hoffend J, Wacker J, Hartschuh W. Preoperative ultrasonographic identification of the sentinel lymph node in patients with malignant melanoma. *Cancer.* 15 de abril de 2003;97(8):1947-54.
47. Rossi CR, Mocellin S, Scagnet B, Foletto M, Vecchiato A, Pilati P, et al. The role of preoperative ultrasound scan in detecting lymph node metastasis before sentinel node biopsy in melanoma patients. *J Surg Oncol.* junio de 2003;83(2):80-4.
48. Rubaltelli L, Beltrame V, Scagliori E, Bezzon E, Frigo AC, Rastrelli M, et al. Potential use of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in the detection of metastatic superficial lymph nodes in melanoma patients. *Ultraschall Med Stuttg Ger* 1980. febrero de 2014;35(1):67-71.
49. Sanki A, Uren RF, Moncrieff M, Tran KL, Scolyer RA, Lin H-Y, et al. Targeted high-resolution ultrasound is not an effective substitute for sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de noviembre de 2009;27(33):5614-9.
50. Starritt EC, Uren RF, Scolyer RA, Quinn MJ, Thompson JF. Ultrasound examination of sentinel nodes in the initial assessment of patients with primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol.* enero de 2005;12(1):18-23.

51. Ungureanu L, Botar Jid C, Candrea E, Cosgarea R, Șenilă SC. The role of lymph node ultrasound evaluation in melanoma - review of the literature. *Med Ultrason.* junio de 2016;18(2):224-30.
52. van Rijk MC, Teertstra HJ, Peterse JL, Nieweg OE, Olmos RAV, Hoefnagel CA, et al. Ultrasonography and fine-needle aspiration cytology in the preoperative evaluation of melanoma patients eligible for sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol.* noviembre de 2006;13(11):1511-6.
53. Voit C, Kron M, Schäfer G, Schoengen A, Audring H, Lukowsky A, et al. Ultrasound-guided Fine Needle Aspiration Cytology prior to Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma Patients. *Ann Surg Oncol.* 11 de diciembre de 2006;13(12):1682-9.
54. Voit CA, van Akkooi ACJ, Eggermont AMM, Schäfer-Hesterberg G, Kron M, Ulrich J, et al. Fine needle aspiration cytology of palpable and nonpalpable lymph nodes to detect metastatic melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 7 de diciembre de 2011;103(23):1771-7.
55. Voit CA, Gooskens SLM, Siegel P, Schaefer G, Schoengen A, Röwert J, et al. Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology as an addendum to sentinel lymph node biopsy can perfect the staging strategy in melanoma patients. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* septiembre de 2014;50(13):2280-8.
56. Voit C, Van Akkooi ACJ, Schäfer-Hesterberg G, Schoengen A, Kowalczyk K, Roewert JC, et al. Ultrasound morphology criteria predict metastatic disease of the sentinel nodes in patients with melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de febrero de 2010;28(5):847-52.
57. Ulrich J, van Akkooi AJC, Eggermont AMM, Voit C. New developments in melanoma: utility of ultrasound imaging (initial staging, follow-up and pre-SLNB). *Expert Rev Anticancer Ther.* noviembre de 2011;11(11):1693-701.
58. Voit CA, van Akkooi ACJ, Schäfer-Hesterberg G, Schoengen A, Schmitz PIM, Sterry W, et al. Rotterdam Criteria for sentinel node (SN) tumor burden and the accuracy of ultrasound (US)-guided fine-needle aspiration cytology (FNAC): can US-guided FNAC replace SN staging in patients with melanoma? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de octubre de 2009;27(30):4994-5000.
59. Ulrich J, van Akkooi ACJ, Eggermont AMM, Voit CA. [Sonographic criteria for diagnosing sentinel node metastases in melanoma patients]. *Ultraschall Med Stuttg Ger 1980.* abril de 2015;36(2):149-53.
60. Stewart FW,, Copeland MM. Neurogenic sarcoma. *Am J Cancer.* 1931;15:1235-320.
61. Holt JB, Sanguenza OP, Levine EA, Shen P, Bergman S, Geisinger KR, et al. Nodal melanocytic nevi in sentinel lymph nodes. Correlation with melanoma-associated cutaneous nevi. *Am J Clin Pathol.* enero de 2004;121(1):58-63.

62. Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Nevus cells in lymph nodes: an association with congenital cutaneous nevi. *Am J Dermatopathol.* febrero de 2002;24(1):1-5.
63. Bautista NC, Cohen S, Anders KH. Benign melanocytic nevus cells in axillary lymph nodes. A prospective incidence and immunohistochemical study with literature review. *Am J Clin Pathol.* julio de 1994;102(1):102-8.
64. Brennick JB, Yan S. False-positive cells in sentinel lymph nodes. *Semin Diagn Pathol.* mayo de 2008;25(2):116-9.
65. Johnson WT, Helwig EB. Benign nevus cells in the capsule of lymph nodes. *Cancer.* marzo de 1969;23(3):747-53.
66. Hart WR. Primary nevus of a lymph node. *Am J Clin Pathol.* enero de 1971;55(1):88-92.
67. Piana S, Tagliavini E, Ragazzi M, Zanelli M, Zalaudek I, Ciarrocchi A, et al. Lymph node melanocytic nevi: pathogenesis and differential diagnoses, with special reference to p16 reactivity. *Pathol Res Pract.* mayo de 2015;211(5):381-8.
68. Begum SMKN, Lomme M, Quddus MR. Nodal combined blue nevus and benign nevus cells in multiple axillary sentinel nodes in a patient with breast carcinoma: report of a case. *Int J Surg Pathol.* septiembre de 2014;22(6):570-3.
69. Biddle DA, Evans HL, Kemp BL, El-Naggar AK, Harvell JD, White WL, et al. Intraparenchymal nevus cell aggregates in lymph nodes: a possible diagnostic pitfall with malignant melanoma and carcinoma. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2003;27(5):673-81.
70. McCarthy SW, Palmer AA, Bale PM, Hirst E. Naevus cells in lymph nodes. *Pathology (Phila).* octubre de 1974;6(4):351-8.
71. Patterson JW. Nevus cell aggregates in lymph nodes. *Am J Clin Pathol.* enero de 2004;121(1):13-5.
72. Ross AL, Sanchez MI, Grichnik JM. Nevogenesis: a benign metastatic process? *ISRN Dermatol.* 2011;2011:813513.
73. Kim H-S, Lee SH, Moon H-S, Kim YW. Intradermal melanocytic nevus with lymphatic nevus cell embolus: A case report. *Oncol Lett.* febrero de 2014;7(2):331-3.
74. Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Thompson JF. Pathologic examination of sentinel lymph nodes from melanoma patients. *Semin Diagn Pathol.* mayo de 2008;25(2):100-11.
75. Ivan D, Prieto VG. Use of immunohistochemistry in the diagnosis of melanocytic lesions: applications and pitfalls. *Future Oncol Lond Engl.* julio de 2010;6(7):1163-75.

76. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*. 24 de julio de 1980;286(5771):400-1.
77. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 de junio de 1965;19(6):739-44.
78. Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem*. 1 de septiembre de 1978;89(2):379-88.
79. Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. *Eur J Biochem*. mayo de 1981;116(1):79-86.
80. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*. 1 de junio de 2006;396(Pt 2):201-14.
81. F S, A N. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008;12(4):198-204.
82. Emberley ED, Niu Y, Leygue E, Tomes L, Gietz RD, Murphy LC, et al. Psoriasin Interacts with Jab1 and Influences Breast Cancer Progression. *Cancer Res*. 15 de abril de 2003;63(8):1954-61.
83. Hsieh H-L, Schäfer BW, Sasaki N, Heizmann CW. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 25 de julio de 2003;307(2):375-81.
84. Gaynor R, Herschman HR, Irie R, Jones P, Morton D, Cochran A. S100 protein: a marker for human malignant melanomas? *Lancet Lond Engl*. 18 de abril de 1981;1(8225):869-71.
85. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S 100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer*. 1 de septiembre de 1982;50(5):912-8.
86. Palazzo J, Duray PH. Typical, dysplastic, congenital, and Spitz nevi: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol*. abril de 1989;20(4):341-6.
87. Thomson W, MacKie RM. Comparison of five antimelanoma antibodies for identification of melanocytic cells on tissue sections in routine dermatopathology. *J Am Acad Dermatol*. diciembre de 1989;21(6):1280-4.
88. Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol*. enero de 2003;11(1):11-5.
89. Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical

- diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol.* febrero de 2001;25(2):205-11.
90. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fisher DE. Role for microphthalmia transcription factor in the diagnosis of metastatic malignant melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* marzo de 2002;10(1):47-51.
91. Gajjar NA, Cochran AJ, Binder SW. Is MAGE-1 expression in metastatic malignant melanomas really helpful? *Am J Surg Pathol.* julio de 2004;28(7):883-8.
92. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* septiembre de 2008;32(9):1291-8.
93. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* mayo de 2008;35(5):433-44.
94. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Shimosato Y, Motoi M, Lennert K. S-100 protein in Langerhans cells, interdigitating reticulum cells and histiocytosis X cells. *Gan.* junio de 1982;73(3):429-32.
95. Coindre JM, de Mascarel A, Trojani M, de Mascarel I, Pages A. Immunohistochemical study of rhabdomyosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin. *J Pathol.* junio de 1988;155(2):127-32.
96. Ordóñez NG, Mahfouz SM, Mackay B. Synovial sarcoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol.* julio de 1990;21(7):733-49.
97. Ordóñez NG. Application of immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas: a review and update. *Adv Anat Pathol.* marzo de 1998;5(2):67-85.
98. Ordóñez NG. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol.* febrero de 2014;45(2):191-205.
99. Shidham VB, Qi D, Rao RN, Acker SM, Chang C-C, Kampalath B, et al. Improved immunohistochemical evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma with 'MCW melanoma cocktail'--a mixture of monoclonal antibodies to MART-1, Melan-A, and tyrosinase. *BMC Cancer.* 7 de mayo de 2003;3:15.
100. Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, et al. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 de junio de 1996;93(12):5915-9.
101. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen

- recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de abril de 1994;91(9):3515-9.
102. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*. 1 de julio de 1994;180(1):347-52.
103. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1 de julio de 1994;180(1):35-42.
104. Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, Ennis W, Wang X, Tupesis JP, et al. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods*. 10 de marzo de 1997;202(1):13-25.
105. Rochaix P, Lacroix-Triki M, Lamant L, Pichereaux C, Valmary S, Puente E, et al. PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. mayo de 2003;16(5):481-90.
106. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. agosto de 1998;11(8):740-6.
107. Reinke S, Königer P, Herberth G, Audring H, Wang H, Ma J, et al. Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol*. octubre de 2005;27(5):401-6.
108. Plaza JA, Suster D, Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. diciembre de 2007;15(4):421-5.
109. Sundram U, Harvell JD, Rouse RV, Natkunam Y. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and MelanA. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. agosto de 2003;16(8):802-10.
110. Busam KJ, Kucukgöl D, Sato E, Frosina D, Teruya-Feldstein J, Jungbluth AA. Immunohistochemical analysis of novel monoclonal antibody PNL2 and comparison with other melanocyte differentiation markers. *Am J Surg Pathol*. marzo de 2005;29(3):400-6.
111. Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM. HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol*. febrero de 2004;35(2):217-23.

112. Zhang H, Bu H, Chen H, Wei B, Liu W, Guo J, et al. Comparison of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of adrenocortical tumors: immunohistochemical analysis of adrenocortical tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. enero de 2008;16(1):32-9.
113. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J*. agosto de 2000;32(8):475-81.
114. Fetsch PA, Marincola FM, Filie A, Hijazi YM, Kleiner DE, Abati A. Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART-1): the advent of a preferred immunocytochemical antibody for the diagnosis of metastatic malignant melanoma with fine-needle aspiration. *Cancer*. 25 de febrero de 1999;87(1):37-42.
115. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol*. mayo de 1998;22(5):595-602.
116. Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, melan-A, and MAGE-1 in HMB45-negative melanomas. *Am J Surg Pathol*. enero de 2002;26(1):82-7.
117. Winnepenninckx V, De Vos R, Stas M, van den Oord JJ. New phenotypical and ultrastructural findings in spindle cell (desmoplastic/neurotropic) melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. diciembre de 2003;11(4):319-25.
118. Kay PA, Pinheiro AD, Lohse CM, Pankratz VS, Olsen KD, Lewis JE, et al. Desmoplastic melanoma of the head and neck: histopathologic and immunohistochemical study of 28 cases. *Int J Surg Pathol*. enero de 2004;12(1):17-24.
119. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol*. marzo de 2001;54(3):196-200.
120. Orchard G. Evaluation of melanocytic neoplasms: application of a pan-melanoma antibody cocktail. *Br J Biomed Sci*. 2002;59(4):196-202.
121. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr*. abril de 2013;104(3):181-203.
122. Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. noviembre de 2008;35 Suppl 2:1-10.

123. Stewart CJ, Nandini CL, Richmond JA. Value of A103 (melan-A) immunostaining in the differential diagnosis of ovarian sex cord stromal tumours. *J Clin Pathol.* marzo de 2000;53(3):206-11.
124. Ac T, St T, G R, Ms M. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res.* octubre de 2005;18(5):322-36.
125. Am G, Am V, D H, F G, Ma M. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol.* mayo de 1986;123(2):195-203.
126. Bacchi CE, Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Gown AM. Hmb-45: A Review. *Appl Immunohistochem.* 1 de enero de 1996;4(2):73-85.
127. Mochii M, Takeuchi T, Kodama R, Agata K, Eguchi G. The expression of melanosomal matrix protein in the transdifferentiation of pigmented epithelial cells into lens cells. *Cell Differ.* marzo de 1988;23(1-2):133-41.
128. Lee ZH, Hou L, Moellmann G, Kuklinska E, Antol K, Fraser M, et al. Characterization and Subcellular Localization of Human Pmel 17/silver, a 100-kDa (Pre)Melanosomal Membrane Protein Associated With 5,6,-Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid (DHICA) Converting Activity. *J Invest Dermatol.* abril de 1996;106(4):605-10.
129. Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol.* 19 de febrero de 2001;152(4):809-24.
130. Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* noviembre de 2008;35 Suppl 2:1-10.
131. Dean NR, Brennan J, Haynes J, Goddard C, Cooter RD. Immunohistochemical labeling of normal melanocytes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* septiembre de 2002;10(3):199-204.
132. Ordóñez NG, Ji XL, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol.* octubre de 1988;90(4):385-90.
133. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 staining of dysplastic nevi. Support for a spectrum of progression toward melanoma. *Am J Surg Pathol.* agosto de 1989;13(8):680-4.
134. Ahmed I, Piepkorn M, Goldgar DE, Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Skolnick MH, et al. HMB-45 staining of dysplastic melanocytic nevi in melanoma risk groups. *J Cutan Pathol.* agosto de 1991;18(4):257-60.
135. Harvell JD, Bastian BC, LeBoit PE. Persistent (recurrent) Spitz nevi: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular pathologic study of 22 cases. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2002;26(5):654-61.

136. Skelton HG, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. A reflection of cellular activation. *Am J Dermatopathol.* diciembre de 1991;13(6):543-50.
137. Wood WS, Tron VA. Analysis of HMB-45 immunoreactivity in common and cellular blue nevi. *J Cutan Pathol.* agosto de 1991;18(4):261-3.
138. Shah IA, Gani OS, Wheler L. Comparative immunoreactivity of CD-68 and HMB-45 in malignant melanoma, neural tumors and nevi. *Pathol Res Pract.* 1997;193(7):497-502.
139. Busam KJMD, Iversen KBS, Coplan KCBS, Jungbluth AAMD. Analysis of Microphthalmia Transcription Factor Expression in Normal Tissues and Tumors, and Comparison of Its Expression With S-100 Protein, gp100, and Tyrosinase in Desmoplastic Malignant Melanoma. *J Surg Pathol.* febrero de 2001;25(2):197-204.
140. Granter SRMD, Weilbaecher KNMD, Quigley CF, Fletcher CDMMD, Fisher DEMD. Microphthalmia Transcription Factor: Not A Sensitive or Specific Marker for the Diagnosis of Desmoplastic Melanoma and Spindle Cell (Non-Desmoplastic) Melanoma. *J Dermatopathol.* junio de 2001;23(3):185-9.
141. Anstey A, Cerio R, Ramnarain N, Orchard G, Smith N, Jones EW. Desmoplastic malignant melanoma. An immunocytochemical study of 25 cases. *Am J Dermatopathol.* febrero de 1994;16(1):14-22.
142. Carlson JA, Dickersin GR, Sober AJ, Barnhill RL. Desmoplastic neurotropic melanoma. A clinicopathologic analysis of 28 cases. *Cancer.* 15 de enero de 1995;75(2):478-94.
143. Busam KJ. The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours. *Pathology (Phila).* octubre de 2004;36(5):462-9.
144. el-Naggar AK, Ordóñez NG, Sara A, McLemore D, Batsakis JG. Clear cell sarcomas and metastatic soft tissue melanomas. A flow cytometric comparison and prognostic implications. *Cancer.* 15 de abril de 1991;67(8):2173-9.
145. Lucas DR, Nascimento AG, Sim FH. Clear cell sarcoma of soft tissues. Mayo Clinic experience with 35 cases. *Am J Surg Pathol.* diciembre de 1992;16(12):1197-204.
146. d'Amore ES, Ninfo V. Clear cell tumors of the somatic soft tissues. *Semin Diagn Pathol.* noviembre de 1997;14(4):270-80.
147. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fletcher CD, Fisher DE. Clear cell sarcoma shows immunoreactivity for microphthalmia transcription factor: further evidence for melanocytic differentiation. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* enero de 2001;14(1):6-9.

148. Deavers MT, Malpica A, Ordonez NG, Silva EG. Ovarian steroid cell tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin with inhibin. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol*. abril de 2003;22(2):162-7.
149. Argani P, Laé M, Hutchinson B, Reuter VE, Collins MH, Perentesis J, et al. Renal carcinomas with the t(6;11)(p21;q12): clinicopathologic features and demonstration of the specific alpha-TFEB gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. *Am J Surg Pathol*. febrero de 2005;29(2):230-40.
150. Unger PD, Hoffman K, Thung SN, Pertsemlides D, Wolfe D, Kaneko M. HMB-45 reactivity in adrenal pheochromocytomas. *Arch Pathol Lab Med*. febrero de 1992;116(2):151-3.
151. Fraga M, García-Caballero T, Antúnez J, Couce M, Beiras A, Forteza J. A comparative immunohistochemical study of phaeochromocytomas and paragangliomas. *Histol Histopathol*. julio de 1993;8(3):429-36.
152. Landas SK, Leigh C, Bonsib SM, Layne K. Occurrence of melanin in pheochromocytoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. marzo de 1993;6(2):175-8.
153. Moreno AM, Castilla-Guerra L, Martínez-Torres MC, Torres-Olivera F, Fernández E, Galera-Davidson H. Expression of neuropeptides and other neuroendocrine markers in human phaeochromocytomas. *Neuropeptides*. abril de 1999;33(2):159-63.
154. Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, et al. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumours. An immunohistochemical study on paraffin sections. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988;413(1):17-24.
155. Bonetti F, Colombari R, Manfrin E, Zamboni G, Martignoni G, Mombello A, et al. Breast carcinoma with positive results for melanoma marker (HMB-45). HMB-45 immunoreactivity in normal and neoplastic breast. *Am J Clin Pathol*. octubre de 1989;92(4):491-5.
156. Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Mombello A, Colombari R, Zamboni G, et al. False-positive immunostaining of normal epithelia and carcinomas with ascites fluid preparations of antimelanoma monoclonal antibody HMB45. *Am J Clin Pathol*. abril de 1991;95(4):454-9.
157. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 15 de abril de 1994;264(5157):436-40.
158. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 16 de diciembre de 1993;366(6456):704-7.

159. Mihic-Probst D, Saremaslani P, Komminoth P, Heitz PU. Immunostaining for the tumour suppressor gene p16 product is a useful marker to differentiate melanoma metastasis from lymph-node nevus. *Virchows Arch Int J Pathol.* diciembre de 2003;443(6):745-51.
160. Botti G, Marra L, Anniciello A, Scognamiglio G, Gigantino V, Cantile M. Immune-phenotypical markers for the differential diagnosis of melanocytic lesions. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):9742-51.
161. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* mayo de 2000;6(5):1845-53.
162. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol.* 26 de octubre de 2015;10:195.
163. Reed JA, Loganzo F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 1 de julio de 1995;55(13):2713-8.
164. Hilton DA, Penney M, Evans B, Sanders H, Love S. Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. *Am J Surg Pathol.* abril de 2002;26(4):472-8.
165. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 21 de abril de 1994;368(6473):753-6.
166. Liggett WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* marzo de 1998;16(3):1197-206.
167. Corbalán-Vélez R, Oviedo-Ramírez I, Ruiz-Maciá JA, Conesa-Zamora P, Sánchez-Hernández M, Martínez-Barba E, et al. [Immunohistochemical staining of p16 in squamous cell carcinomas of the genital and extragenital area]. *Actas Dermosifiliogr.* agosto de 2011;102(6):439-47.
168. Murao K, Kubo Y, Takiwaki H, Arase S, Matsumoto K. Bowen's disease on the sole: p16INK4a overexpression associated with human papillomavirus type 16. *Br J Dermatol.* enero de 2005;152(1):170-3.
169. Jennings C, Kim J. Identification of nodal metastases in melanoma using sox-10. *Am J Dermatopathol.* julio de 2011;33(5):474-82.
170. Willis BC, Johnson G, Wang J, Cohen C. SOX10: a useful marker for identifying metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* febrero de 2015;23(2):109-12.

171. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* marzo de 2013;104(2):99-127.
172. Nielsen PS, Spaun E, Riber-Hansen R, Steiniche T. Automated quantification of MART1-verified Ki-67 indices: useful diagnostic aid in melanocytic lesions. *Hum Pathol.* junio de 2014;45(6):1153-61.
173. Lohmann CM, Iversen K, Jungbluth AA, Berwick M, Busam KJ. Expression of melanocyte differentiation antigens and ki-67 in nodal nevi and comparison of ki-67 expression with metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol.* octubre de 2002;26(10):1351-7.
174. Kanner WA, Barry CI, Smart CN, Frishberg DP, Binder SW, Wick MR. Reticulin and NM23 staining in the interpretation of lymph nodal nevus rests. *Am J Dermatopathol.* junio de 2013;35(4):452-7.
175. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuna MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 2004;164(1):193–203.
176. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol.* mayo de 2007;34(5):370-5.
177. Chen P-L, Chen W-S, Li J, Lind AC, Lu D. Diagnostic utility of neural stem and progenitor cell markers nestin and SOX2 in distinguishing nodal melanocytic nevi from metastatic melanomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* enero de 2013;26(1):44-53.
178. Kappes F, Burger K, Baack M, Fackelmayer FO, Gruss C. Subcellular Localization of the Human Proto-oncogene Protein DEK. *J Biol Chem.* 13 de julio de 2001;276(28):26317-23.
179. Soekarman D, von Lindern M, van der Plas DC, Selleri L, Bartram CR, Martiat P, et al. Dek-can rearrangement in translocation (6;9)(p23;q34). *Leukemia.* junio de 1992;6(6):489-94.
180. von Lindern M, Fornerod M, van Baal S, Jaegle M, de Wit T, Buijs A, et al. The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA. *Mol Cell Biol.* abril de 1992;12(4):1687-97.
181. Riveiro-Falkenbach E, Ruano Y, García-Martín RM, Lora D, Cifdaloz M, Acquadro F, et al. DEK oncogene is overexpressed during melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* marzo de 2017;30(2):194-202.
182. Evans AJ, Gallie BL, Jewett MAS, Pond GR, Vandezande K, Underwood J, et al. Defining a 0.5-mb region of genomic gain on chromosome 6p22 in

- bladder cancer by quantitative-multiplex polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* enero de 2004;164(1):285-93.
183. Grasemann C, Gratias S, Stephan H, Schöler A, Schramm A, Klein-Hitpass L, et al. Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene.* 20 de junio de 2005;24(42):6441-9.
184. Von Lindern M, Fornerod M, Soekarman N, Van Baal S, Jaegle M, Hagemeijer A, et al. Translocation t(6;9) in acute non-lymphocytic leukaemia results in the formation of a DEK-CAN fusion gene. *Baillières Clin Haematol.* 1 de octubre de 1992;5(4):857-79.
185. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, et al. DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene.* 19 de agosto de 2010;29(33):4671-81.
186. Khodadoust MS, Verhaegen M, Kappes F, Riveiro-Falkenbach E, Cigudosa JC, Kim DSL, et al. Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene. *Cancer Res.* 15 de agosto de 2009;69(16):6405-13.
187. Carro MS, Spiga FM, Quarto M, Di Ninni V, Volorio S, Alcalay M, et al. DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types. *Cell Cycle Georget Tex.* junio de 2006;5(11):1202-7.
188. Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire JA. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *J Clin Pathol.* enero de 2007;60(1):1-7.
189. Kavanaugh GM, Wise-Draper TM, Morreale RJ, Morrison MA, Gole B, Schwemberger S, et al. The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair. *Nucleic Acids Res.* septiembre de 2011;39(17):7465-76.
190. Riveiro-Falkenbach E, Soengas MS. Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de junio de 2010;16(11):2932-8.
191. Wise-Draper TM, Mintz-Cole RA, Morris TA, Simpson DS, Wikenheiser-Brokamp KA, Currier MA, et al. Overexpression of the cellular DEK protein promotes epithelial transformation in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1 de marzo de 2009;69(5):1792-9.
192. Adams AK, Hallenbeck GE, Casper KA, Patil YJ, Wilson KM, Kimple RJ, et al. DEK promotes HPV-positive and -negative head and neck cancer cell proliferation. *Oncogene.* 12 de febrero de 2015;34(7):868-77.
193. Privette Vinnedge LM, Benight NM, Wagh PK, Pease NA, Nashu MA, Serrano-Lopez J, et al. The DEK oncogene promotes cellular proliferation

- through paracrine Wnt signaling in Ron receptor-positive breast cancers. *Oncogene*. 30 de abril de 2015;34(18):2325-36.
194. Wise-Draper TM, Allen HV, Jones EE, Habash KB, Matsuo H, Wells SI. Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions. *Mol Cell Biol*. octubre de 2006;26(20):7506-19.
195. Wise-Draper TM, Allen HV, Thobe MN, Jones EE, Habash KB, Münger K, et al. The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *J Virol*. noviembre de 2005;79(22):14309-17.
196. Secchiero P, Voltan R, Iasio MG di, Melloni E, Tiribelli M, Zauli G. The Oncogene DEK Promotes Leukemic Cell Survival and Is Downregulated by both Nutlin-3 and Chlorambucil in B-Chronic Lymphocytic Leukemic Cells. *Clin Cancer Res*. 15 de marzo de 2010;16(6):1824-33.
197. Kappes F, Khodadoust MS, Yu L, Kim DSL, Fullen DR, Markovitz DM, et al. DEK expression in melanocytic lesions. *Hum Pathol*. julio de 2011;42(7):932-8.
198. Martinez-Useros J, Rodriguez-Remirez M, Borrero-Palacios A, Moreno I, Cebrian A, Gomez del Pulgar T, et al. DEK is a potential marker for aggressive phenotype and irinotecan-based therapy response in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 16 de diciembre de 2014;14:965.
199. Ying G, Wu Y. DEK: A novel early screening and prognostic marker for breast cancer. *Mol Med Rep*. noviembre de 2015;12(5):7491-5.
200. Lin L, Piao J, Gao W, Piao Y, Jin G, Ma Y, et al. DEK over expression as an independent biomarker for poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 31 de julio de 2013;13:366.
201. Han S, Xuan Y, Liu S, Zhang M, Jin D, Jin R, et al. Clinicopathological significance of DEK overexpression in serous ovarian tumors. *Pathol Int*. julio de 2009;59(7):443-7.
202. Lin L, Piao J, Ma Y, Jin T, Quan C, Kong J, et al. Mechanisms underlying cancer growth and apoptosis by DEK overexpression in colorectal cancer. *PloS One*. 2014;9(10):e111260.
203. Piao J, Shang Y, Liu S, Piao Y, Cui X, Li Y, et al. High expression of DEK predicts poor prognosis of gastric adenocarcinoma. *Diagn Pathol*. 20 de marzo de 2014;9:67.
204. Joung I, Strominger JL, Shin J. Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de junio de 1996;93(12):5991-5.
205. Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 de junio de 1997;94(12):6191-6.

206. Shin J. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Arch Pharm Res.* diciembre de 1998;21(6):629-33.
207. Watanabe Y, Tanaka M. p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. *J Cell Sci.* 15 de agosto de 2011;124(Pt 16):2692-701.
208. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res.* 2012;2(4):397-413.
209. Bjørkøy G, Lamark T, Johansen T. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy.* junio de 2006;2(2):138-9.
210. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 21 de noviembre de 2005;171(4):603-14.
211. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 15 de septiembre de 2004;18(18):2195-224.
212. Durán A, Serrano M, Leitges M, Flores JM, Picard S, Brown JP, et al. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell.* febrero de 2004;6(2):303-9.
213. Martin P, Diaz-Meco MT, Moscat J. The signaling adapter p62 is an important mediator of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation. *EMBO J.* 9 de agosto de 2006;25(15):3524-33.
214. Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de febrero de 2009;182(4):2131-40.
215. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell.* abril de 2008;13(4):343-54.
216. Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell.* 7 de octubre de 2011;44(1):134-46.
217. Thompson HGR, Harris JW, Wold BJ, Lin F, Brody JP. p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene.* 17 de abril de 2003;22(15):2322-33.
218. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue S-I, Suzuki K, Tsukamoto T, et al. Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology.* enero de 2006;48(2):157-61.

219. Botella-Estrada R, Traves V, Requena C, Guillen-Barona C, Nagore E. Correlation of histologic regression in primary melanoma with sentinel node status. *JAMA Dermatol.* agosto de 2014;150(8):828-35.
220. Ribero S, Gualano MR, Osella-Abate S, Scaioli G, Bert F, Sanlorenzo M, et al. Association of Histologic Regression in Primary Melanoma With Sentinel Lymph Node Status: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 1 de diciembre de 2015;151(12):1301-7.
221. Tejera-Vaquerizo A, Nagore E, Puig S, Robert C, Saiag P, Martín-Cuevas P, et al. Effect of time to sentinel-node biopsy on the prognosis of cutaneous melanoma. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* septiembre de 2015;51(13):1780-93.
222. Marone U, Catalano O, Caracò C, Anniciello AM, Sandomenico F, Di Monta G, et al. Can high-resolution ultrasound avoid the sentinel lymph-node biopsy procedure in the staging process of patients with stage I-II cutaneous melanoma? *Ultraschall Med Stuttg Ger 1980.* diciembre de 2012;33(7):E179-185.
223. Ridolfi RL, Rosen PP, Thaler H. Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer.* enero de 1977;39(1):164-71.
224. Carson KF, Wen DR, Li PX, Lana AM, Bailly C, Morton DL, et al. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol.* julio de 1996;20(7):834-40.